Mercodia
Oxidized LDL ELISA

Enzyme immunoassay

Directions for Use
Mode d'emploi
Instruzioni per l'uso
Bruksanvisning
Gebrauchsinformation
Instrucciones para el uso
Brugsanvisning

10-1143-01
REAGENTS FOR 96 DETERMINATIONS



Manufactured by/Hersteller/Fabriqué par/
Fabricado por/Prodotto da/Fremstillet af/
Tillverkad av

Mercodia AB, Sylveniusgatan 8A,
SE-754 50 Uppsala,
Sweden, Schweden, Suède, Suecia, Svezia, Sverige

Mercodia

EXPLANATION OF SYMBOLS USED ON LABELS/ERKLÄRUNG DER SYMBOLE AUF DEN ETIKETTEN/EXPLICATION DES SYMBOLES UTILISES SUR LES ETIQUETTES/EXPLICACIÓN DE LOS SÍMBOLOS UTILIZADOS EN LAS ETIQUETAS/SPIEGAZIONE DEI SIMBOLI USATI SULLE ETICHETTE/FORKLARING AF SYMBOLER ANVENDT PÅ ETIKETTER/FÖRKLARING AV SYMBOLERNA SOM ANVÄNDS PÅ ETIKETTERNA

Σ **= 96**	Reagents for 96 determinations Reagenzien für 96 Bestimmungen Réactifs pour 96 mesures Reactivos para 96 determinaciones Reagenti per 96 rilevazioni Reagens til 96 bestemmelser Reagenser för 96 bestämningar
	Expiry date Verfallsdatum A utiliser avant Fecha de caducidad Data di scadenza Udløbsdato Utgångsdatum
	Store between 2–8°C Lagerungstemperatur 2–8°C A conserver entre 2 et 8°C Conservar a entre 2–8°C Conservare tra i 2–8°C Opbevar ved 2–8°C Förvara vid 2–8°C
LOT	Lot no Lot Nr. N° de lot Nº lote Lotto n. Partinr. Lotnr.
IVD	For *in vitro* diagnostic use Zum Gebrauch in der *in vitro*-Diagnose Ce kit est réservé à l'utilisation diagnostique *in vitro* Para uso diagnóstico *in vitro* Per l'uso diagnostico *in vitro* Til *in vitro*-diagnosticering För *in vitro* diagnostiskt bruk



INTENDED USE

The Mercodia Oxidized LDL ELISA kit is intended to be used for the *in vitro* quantitative measurement of oxidized low density lipoproteins (oxidized LDL) in human blood serum or plasma. Lipoprotein measurements are used in the diagnosis and treatment of lipid disorders (such as diabetes mellitus), atherosclerosis, and various liver and renal diseases.

SUMMARY AND EXPLANATION OF THE TEST

The oxidative conversion of low density lipoproteins (LDL) to oxidized low density lipoproteins (oxidized LDL) is now considered to be a key event in the biological process that initiates and accelerates the development of the early atherosclerotic lesion, the fatty streak [1–5].

Experimental studies have shown that native LDL becomes atherogenic when it is converted to oxidized LDL, and that oxidized LDL is more atherogenic than native LDL[1–5]. Oxidized LDL is found in monocyte-derived macrophages in atherosclerotic lesions, but not in normal arteries [6]. The uptake of LDL into macrophages does not occur by way of the classic Brown/Goldstein LDL receptor [7]. Numerous studies [1–5,8] have established that LDL, the major carrier of blood cholesterol, must first be converted to oxidized LDL so that it can be recognized by "scavenger" or "oxidized LDL receptors" on monocyte-derived macrophages. The binding of oxidized LDL to macrophages is a necessary step by which oxidized LDL induces cholesterol accumulation in macrophages, thus transforming the macrophages into lipid-laden foam cells [8].

Holvoet and his colleagues [9] were the first to clearly demonstrate that patients with coronary artery disease had significantly elevated plasma levels of oxidized LDL, and that these circulating levels of oxidized LDL were very similar in patients with stable coronary artery disease and in patients with acute coronary syndromes. They found plasma oxidized LDL levels to be significantly higher in patients with stable angina, unstable angina and acute myocardial infarction when compared to age matched, presumably healthy control subjects.

In publications by Holvoet [9-13], plasma oxidized LDL levels were measured by a competitive ELISA utilizing a specific murine monoclonal antibody mAb-4E6. It should be noted that the Mercodia Oxidized LDL ELISA kit uses the same specific murine monoclonal antibody, mAb-4E6, that Holvoet [9,10] used in his assays. However, the Mercodia assay kit is a capture ELISA (also known as a "sandwich" ELISA), in which the wells of the microtiter plates are coated with the capture antibody mAb-4E6.

Several noteworthy studies have been reported by clinical researchers who have used the Mercodia Oxidized LDL ELISA kits. Hulthe and Fagerberg [14] demonstrated the relationship between subclinical atherosclerosis and circulating oxidized LDL levels by showing that oxidized LDL levels were related to intima-media thickness and plaque occurrence in the carotid and femoral arteries. Sigurdardottir, Fagerberg and Hulthe [15] found elevated levels of oxidized LDL in patients with metabolic syndrome. In addition, they found that elevated oxidized LDL levels in metabolic syndrome patients were associated with small LDL-particle size. Kopprasch *et al.* [16] found elevated levels of circulating oxidized LDL in subjects with impaired glucose tolerance (IGT). And Duntas, Mantzou and Koutras [17] found significantly elevated plasma oxidized LDL levels in untreated patients with overt hypothyroidism.

At the American Heart Association Scientific Sessions 2002, Johnston *et al.* [18] reported that plasma levels of oxidized LDL were substantially higher in patients with unstable coronary artery disease compared to healthy controls. Most important, there was no significant difference

between the cholesterol levels of the unstable coronary artery disease patients and the healthy controls. (References page 93).

PRINCIPLE OF THE PROCEDURE

Mercodia Oxidized LDL ELISA is a solid phase two-site enzyme immunoassay. It is based on the direct sandwich technique in which two monoclonal antibodies are directed against separate antigenic determinants on the oxidized apolipoprotein B molecule. During incubation oxidized LDL in the sample reacts with anti-oxidized LDL antibodies bound to microtitration well. After washing, which removes non-reactive plasma components, a peroxidase conjugated anti-human apolipoprotein B antibody recognizes the oxidized LDL bound to the solid phase. After a second incubation and a simple washing step that removes unbound enzyme labeled antibody, the bound conjugate is detected by reaction with 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). The reaction is stopped by adding acid to give a colorimetric endpoint, then read spectrophotometrically.

WARNINGS AND PRECAUTIONS

- For *in vitro* diagnostic use. Not for internal or external use in humans or animals.
- The content of this kit and their residues must not be allowed to come into contact with ruminating animals or swine.
- The Stop Solution in this kit contains 0.5 M H_2SO_4. Follow routine precautions for handling hazardous chemicals.
- All patient samples should be handled as capable of transmitting infections.

Warning! This kit contains reagents that may be infectious!

This kit contains reagents manufactured from human blood components. The source of material have been tested by immunoassay for Hepatitis B surface antigen, antibodies for Hepatitis C virus and for antibodies for HIV virus and found to be negative. Nevertheless, all recommended precautions for the handling of blood derivatives should be observed. Please refer to HHS Publication no. (CDC) 88-8395 or corresponding local/national guidelines on laboratory safety procedures.

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

- Pipettes for 25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl and 1000 µl (repeat pipettes preferred for addition of enzyme conjugate solution, Substrate TMB and Stop Solution)
- Beakers and cylinders for reagent preparation
- Redistilled water
- Test tubes with caps, 3.5 ml
- Microplate reader 450 nm filter
- Plate shaker (The recommended velocity is 700-900 cycles per minute, orbital movement)
- Microplate washing device
- Appropriate mixing device

REAGENTS

Each Mercodia Oxidized LDL ELISA kit contains reagents for 96 wells, sufficient for 40 samples, two Controls and one calibrator curve in duplicate. For larger series of assays, use pooled reagents from packages bearing identical lot numbers. The expiry date for the complete kit is stated on the outer label. The recommended storage temperature is 2–8°C.

Coated Plate Mouse monoclonal anti-oxidized LDL For unused microplate strips, reseal the bag using adhesive tape, store at 2–8°C and use within 8 weeks.	1 plate	96 wells 8-well strips	Ready for Use
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 Human oxidized LDL Color coded yellow Concentration indicated on vial label. Storage after reconstitution: 2–8°C for 1 week. For storage of reconstituted Calibrators for more than 1 week, store at -20°C.	5 vials	1000 µl	Lyophilized Add 1000 µl redistilled water per vial.
Calibrator 0 Color coded yellow	1 vial	1000 µl	Ready for Use
Controls (H), (L) Antigen concentration indicated on vial label. Storage after reconstitution: 2–8°C for 1 week. For storage of reconstituted Controls for more than 1 week, store at -20°C.	2 vials	1000 µl	Lyophilized Add 1000 µl redistilled water per vial.
Enzyme Conjugate 11X Peroxidase conjugated mouse monoclonal anti-apoB	1 vial	1.2 ml	Preparation, see below
Enzyme Conjugate Buffer Color coded blue.	1 vial	12 ml	Ready for use
Assay Buffer Color coded red	1 vial	12 ml	Ready for use
Sample Buffer 4X Color coded yellow *Note!* Precipitate may occur when stored at 2-8 °C. Allow Sample Buffer 4X to reach room temperature. Mix until precipitate has dissolved. Storage after dilution: 2-8 °C for 4 weeks.	1 bottle	50 ml	Dilute with 150 ml redistilled water to make sample 1X solution.
Wash Buffer 21X Storage after dilution: 2-8°C for 4 weeks.	1 bottle	50 ml	Dilute with 1000 ml redistilled water to make wash buffer 1X solution
Substrate TMB Colorless solution *Note! Light sensitive!*	1 bottle	22 ml	Ready for Use
Stop Solution 0.5 M H_2SO_4	1 vial	7 ml	Ready for Use

Preparation of enzyme conjugate 1X solution

Prepare the needed volume of enzyme conjugate 1X solution by dilution of Enzyme Conjugate 11X (1+10) in Enzyme Conjugate Buffer according to the table below. When preparing enzyme conjugate 1X solution for the whole plate, pour all of the Enzyme Conjugate Buffer into the Enzyme Conjugate 11X vial. Mix gently.

Number of strips	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 strips	1 vial	1 vial
8 strips	700 µl	7.0 ml
6 strips	500 µl	5.0 ml
4 strips	350 µl	3.5 ml

Storage after dilution: 2-8°C for 1 month.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

The recommended use of specimen in the Mercodia Oxidized LDL ELISA is fresh EDTA-plasma. Heparin-plasma and serum may also be used.

Plasma

Collect blood by venipuncture in tubes containing EDTA or heparin as anticoagulant, and separate the plasma fraction. Samples can be stored at –80°C for at least six months. Avoid repeated freezing and thawing.

Serum

Collect blood by venipuncture, allow to clot, and separate the serum by centrifugation. Samples can be stored at –80°C for at least six months. Avoid repeated freezing and thawing.

DILUTION OF SAMPLES

Prepare two tubes for each patient sample. Each sample has to be diluted in two steps to a final dilution of 1/6561 as follows:

1	Patient samples	25 µl	
	Sample buffer 1X solution	2000 µl	
	Cap tubes, invert three times and vortex-mix*		Dilution 1/81
2	1/81 dilution of sample	25 µl	
	Sample buffer1X solution	2000 µl	
	Cap tubes, invert three times and vortex-mix*		Dilution 1/6561

* It is IMPORTANT to ensure that each dilution step is properly mixed before the next step.

As a result of this procedure the samples will be diluted 1/6561.

TEST PROCEDURE

All reagents and samples must be brought to room temperature before use.
Prepare a standard curve for each assay run.

1 Prepare enzyme conjugate 1X solution, sample buffer 1X solution, wash buffer1X solution and samples.
2 Prepare sufficient Coated Plate wells to accommodate Calibrators, Controls and samples in duplicate.
3 Pipette 25 µl of each Calibrator, Control and diluted sample into appropriate wells.
4 Add 100 µl Assay Buffer to each well.
5 Incubate on a plate shaker (700-900 rpm) for 2 hours at room temperature (18–25°C).
6 Wash 6 times with 700 µl wash buffer 1X solution per well using an automatic plate washer with overflow-wash function.
Or manually,
discard the reaction volume by inverting the microplate over a sink. Add 350µl wash buffer 1X solution to each well. Discard the wash solution, tap firmly several times against absorbent paper to remove excess liquid. Repeat 5 times. Avoid prolonged soaking during washing procedure.
7 Add 100 µl enzyme conjugate 1X solution to each well.
8 Incubate on a plate shaker for 1 hour at room temperature (18–25°C).
9 Wash as described above.
10 Add 200 µl Substrate TMB.
11 Incubate for 15 minutes at room temperature, no shaking.
12 Add 50 µl Stop Solution. Place plate on the shaker for 5 seconds to ensure mixing.
13 Read optical density at 450 nm and calculate results.
Read within 30 minutes.

Note! To prevent contamination between the conjugate and substrate, separate pipettes are recommended.

INTERNAL QUALITY CONTROL

Commercial controls and/or internal plasma/serum pools with low, intermediate and high oxidized LDL concentrations should routinely be assayed as samples, and results charted from day to day. It is good laboratory practice to record the following data for each assay: kit lot number, reconstitution dates of kit components OD values for the blank, Calibrators and Controls.

CALCULATION OF RESULTS

Computerized calculation

The concentration of oxidized LDL is obtained by computerized data reduction of the absorbance for the Calibrators, except for Calibrator O, versus the concentration using cubic spline regression. Multiply the concentration of the samples with the dilution factor (e.g. × 6561).

Manual calculation

1. Plot the absorbance values obtained for the Calibrators, except Calibrator 0, against the Oxidized LDL concentration on a lin-log paper and construct a calibrator curve.
2. Read the concentration of the Controls and unknown samples from the calibrator curve.
3. Multiply the concentration of the Controls and the samples with the dilution factor (e.g. × 6561).

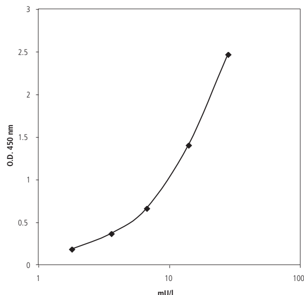
Example of results

Wells	Identity	A450 nm	Conc. mU/l	U/l**
1A–B	Calibrator 0	0.072		
1C–D	Calibrator 1*	0.185		
1E–F	Calibrator 2*	0.369		
1G–H	Calibrator 3*	0.664		
2A–B	Calibrator 4*	1.405		
2C–D	Calibrator 5*	2.469		
2E–F	Control (H)	1.234	12.2	80.04
2G–H	Control (L)	0.513	5.2	34.12

*Concentration indicated on vial label.
**Result multiplied by dilution factor (× 6561).

Example of calibrator curve

A typical calibrator curve is shown here. Do not use this curve to determine actual assay results.



English

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

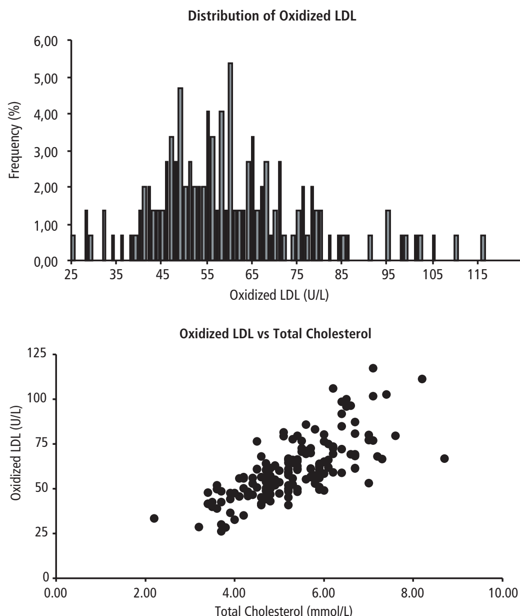
As with all diagnostic tests, a definitive diagnosis should not be based on the results of a single test, but should be made by the physician after all clinical findings have been evaluated.

Grossly lipemic, icteric or hemolyzed samples do not interfere in the assay.

EXPECTED VALUES

Good practice dictates that each laboratory establishes its own expected range of values. The following results may serve as a guide until the laboratory has gathered sufficient data of its own.

The following results were obtained from 149 ambulatory, randomly selected individuals in the Stockholm area, Sweden.



The following results were obtained from 149 ambulatory, randomly selected individuals in the Stockholm area, Sweden

	Mean	Median	Range
OxLDL (U/l)*	61	59	26–117
Chol/HDL ratio**	4.10	3.90	1.68–7.89

* Arbitrary units. See CALIBRATION.
** Measured data Cholesterol (mmol/l) and HDL (mmol/l).

Distribution of Oxidized LDL and Cholesterol/HDL ratio

Oxidized LDL U/l	Cholesterol/HDL Ratio	Patient/Total (%)	
	Quartile 1		
Q1 (26–49)	1.68–3.13	22/149	(14.8)
Q2 (50–59)	1.68–3.13	10/149	(6.7)
Q3 (60–69)	1.68–3.13	5/149	(3.4)
Q4 (70–117)	1.68–3.13	0/149	(0.0)
	Quartile 2		
Q1 (26–49)	3.21–3.86	7/149	(4.7)
Q2 (50–59)	3.21–3.86	17/149	(11.4)
Q3 (60–69)	3.21–3.86	10/149	(6.7)
Q4 (70–117)	3.21–3.86	3/149	(2.0)
	Quartile 3		
Q1 (26–49)	3.87–4.79	7/149	(4.7)
Q2 (50–59)	3.87–4.79	11/149	(7.4)
Q3 (60–69)	3.87–4.79	11/149	(7.4)
Q4 (70–117)	3.87–4.79	9/149	(6.0)
	Quartile 4		
Q1 (26–49)	4.80–7.89	1/149	(0.7)
Q2 (50–59)	4.80–7.89	4/149	(2.7)
Q3 (60–69)	4.80–7.89	7/149	(4.7)
Q4 (70–117)	4.80–7.89	25/149	(16.8)

The following results were obtained from 147 ambulatory, randomly selected individuals in the Stockholm area, Sweden.

	Mean	Median	Range
OxLDL (U/l)*	61	59	26–117
LDL/HDL ratio**	2.51	2.36	0.55–5.56

* Arbitrary units. See CALIBRATION.
** Measured data LDL (mmol/l) and HDL (mmol/l)

Distribution of Oxidized LDL and LDL/HDL ratio

Oxidized LDL U/l	LDL/HDL Ratio		Patient/Total (%)	
		Quartile 1		
Q1 (26–49)	0.55–1.79		19/147	(13.0)
Q2 (50–59)	0.55–1.79		12/147	(8.2)
Q3 (60–69)	0.55–1.79		6/147	(4.1)
Q4 (70–117)	0.55–1.79		0/147	(0.0)
		Quartile 2		
Q1 (26–49)	1.79–2.33		10/147	(6.8)
Q2 (50–59)	1.79–2.33		13/147	(8.8)
Q3 (60–69)	1.79–2.33		10/147	(6.8)
Q4 (70–117)	1.79–2.33		3/147	(2.0)
		Quartile 3		
Q1 (26–49)	2.36–3.08		8/147	(5.4)
Q2 (50–59)	2.36–3.08		11/147	(7.5)
Q3 (60–69)	2.36–3.08		10/147	(6.8)
Q4 (70–117)	2.36–3.08		8/147	(5.4)
		Quartile 4		
Q1 (26–49)	3.09–5.56		0/147	(0.0)
Q2 (50–59)	3.09–5.56		5/147	(3.4)
Q3 (60–69)	3.09–5.56		8/147	(5.4)
Q4 (70–117)	3.09–5.56		24/147	(16.3)

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

Detection Limit

The detection limit is < 1 mU/l calculated as three standard deviations above the Calibrator 0.

Recovery

Recovery upon addition is 85–107% (mean value is 95%)

Precision

Precision was calculated from three samples assayed in 3–8 replicates on 20 different occasions.

Sample	Obtained value	Coefficient of variation %		
	mU/l	within	between	total
1	8.5	5.5	6.2	8.3
2	19	7.3	4.0	8.3
3	32	6.2	4.0	7.4

Dilutions

Sample	Dilution	Obtained value mU/l	Obtained/ Expected
		(Assay 1/ Assay 2)	
Sample 1	1:3321		
	1:6642	19.9/18.3	
	1:13284	9.4/9.5	0.94/1.04
Sample 2	1:3321	–	
	1:6642	20.6/20.4	
	1:13284	10.6/9.8	1.02/0.97
Sample 3	1:3321	29.1/32.0	
	1:6642	15.6/15.5	1.07/0.97
	1:13284	7.7/8.0	1.05/1.00
Sample 4	1:3321	21.6/20.2	
	1:6642	10.4/10.4	0.97/1.03
	1:13284	5.9/5.7	1.08/1.12
Sample 5	1:3321	15.9/15.7	
	1:6642	8.1/8.0	1.02/1.02
	1:13284	4.0/4.4	1.02/1.13

Mean Obtained/Expected value is 1.03, range 0.94–1.13.

Calibration

No international reference is at date available. The Mercodia Oxidized LDL ELISA is calibrated in relative arbitrary units against an in house reference preparation.

WARRANTY

The performance data presented here was obtained using the procedure indicated. Any change or modification in the procedure not recommended by Mercodia AB may affect the results, in which event Mercodia AB disclaims all warranties expressed, implied or statutory, including the implied warranty of merchantability and fitness for use.

Mercodia AB and its authorized distributors, in such event, shall not be liable for damages indirect or consequential.

Deutsch

ZIELSETZUNG

Der Mercodia Oxidized LDL ELISA-Kit dient zur quantitativen *in vitro*-Messung oxidierter low density lipoproteins (oxidierter LDL) in humanem Serum oder Plasma. Lipoproteinmessungen werden in der Diagnose und Behandlung von Fettstoffwechselstörungen (wie Diabetes mellitus), Arteriosklerose und verschiedenen Leber- und Nierenerkrankungen eingesetzt.

ZUSAMMENFASSUNG UND ERKLÄRUNG DES TESTES

Die oxidative Umwandlung von low density lipoproteins (LDL) zu oxidierten low density lipoproteins (oxidierte LDL) gilt heute als eine Hauptursache für den biologischen Prozess, welcher die Entwicklung der arteriosklerotischen Schädigung, dem fettstoffwechselbedingten Schlaganfall [1–5], initiiert und beschleunigt.

Experimentelle Untersuchungen zeigten, dass körpereigenes LDL atherogen wird, wenn es zu oxidiertem LDL umgewandelt wird und dass oxidiertes LDL stärker atherogen ist als körpereigenes LDL [1–5]. Oxidiertes LDL befindet sich in Makrophagen, die sich aus Monozyten gebildet haben, in arteriosklerotischen Schädigungen, aber nicht in normalen Arterien [6]. Die Aufnahme von LDL in Makrophagen geschieht über den klassischen Brown/Goldstein-LDL Rezeptor[7]. Zahlreiche Untersuchungen [1–5,8] haben ergeben, dass LDL, der wesentliche Carrier von Cholesterin, zuerst in oxidiertes LDL umgewandelt werden muss, um von den Scavenger- oder Rezeptoren für oxidiertes LDL auf den Makrophagen erkannt zu werden. Die Bindung von oxidiertem LDL an Makrophagen ist ein notwendiger Schritt, bei dem oxidierte LDL die Cholesterinansammlung in den Makrophagen hervorruft, und die Makrophagen damit in lipidreichen Zellenschaum umwandelt [8].

Holvoet und seine Mitarbeiter [9] konnten als erste klar demonstrieren, dass Patienten mit Herzkranzgefäßerkrankungen deutlich erhöhte Plasmakonzentrationen an oxidiertem LDL aufwiesen und dass diese Kreislaufkonzentrationen an oxidiertem LDL ähnlich zu den Patienten mit stabilen Herzkranzgefäßerkrankungen und bei Patienten mit akuten Herzkranzgefäßsyndromen waren. Sie fanden heraus, dass bei Patienten mit stabiler Angina, instabiler Angina und akuten Herzinfarkten die Werte für oxidiertes LDL im Plasma im Vergleich zu gleichaltrigen, gesunden Kontrollpersonen signifikant höher waren.

In der Veröffentlichung von Holvoet [9-13] wurden die Konzentrationen von oxidiertem LDL durch einen kompetitiven ELISA mit Hilfe eines spezifischen monoklonalen Mausantikörpers, mAb-4E6, gemessen. Es ist anzumerken, dass der Mercodia Oxidized LDL ELISA denselben monoklonalen Mausantikörper, mAb-4E6, verwendet, den Holvoet [9,10] in seinem Assays verwendet. Der Assay-Kit von Mercodia ist jedoch ein Capture-ELISA (auch als "Sandwich"-ELISA bekannt), in dem die Vertiefungen der Mikrotiterplatten mit dem Capture-Antikörper, mAb-4E6, beschichtet sind.

Es wurden eine Reihe von interessanten Untersuchungen von klinischen Forschern vorgenommen, die die ELISA-Kits für oxidiertes LDL verwendet haben. Hulthe und Fagerberg [14] zeigten die Beziehung zwischen subklinischer Arteriosklerose und den Konzentrationen an oxidertem LDL im Kreislauf, indem sie demonstrierten, dass die Konzentrationen an oxidiertem LDL in Beziehung zur Intimadicke und dem Auftreten von Plaquen in Kopf- und Oberschenkelschlagadern steht. Sigurdardottir, Fagerberg und Hulthe [15] fanden erhöhte Konzentrationen von oxdiertem LDL bei Patienten mit metabolischem Syndrom. Ausserdem stellten sie fest, dass erhöhte Konzentrationen an oxidiertem LDL bei den Patienten mit dem metabolischen Syndrom in Verbindung mit einer geringen Partikelgrösse des LDL stand. Kopprasch *et al.* [16] fanden erhöhte

Konzentrationen an oxidiertem LDL im Kreislauf bei Personen mit beeinträchtiger Glukose-Toleranz (IGT). Und Duntas, Mantzou und Koutras [17] fanden signifikant erhöhte Plasmawerte für oxidiertes LDL bei unbehandelten Patienten mit offenkundiger Hypothyreose.

Bei den American Heart Association Scientific Sessions 2002 berichteten Johnston *et al.* [18], dass die Plasmawerte von oxidiertem LDL bei Patienten mit instabilen Herzkranzgefäßerkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen substantiell höher waren. Am wichtigsten war, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Cholesterinwerten der Patienten mit instabilen Erkrankungen der Herzkranzgefäßarterien und den gesunden Kontrollpersonen gab. (Referenzen seite 93)

DAS TESTPRINZIP

Mercodia Oxidized LDL ELISA Assay ist ein enzymatischer, zweiseitiger Immunoassay mit einer Festphase. Er basiert auf der direkten Sandwich-Technik, bei der zwei monoklonale Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen auf dem oxidierten Apolipoproteinmolekül B ausgerichtet werden. Während der Inkubation reagiert oxidiertes LDL in der Probe mit anti-oxidierten LDL-Antikörper, die an die Vertiefungen in der Mikrotiterplatte gebunden sind. Nach dem Waschen, wobei die nicht-reaktiven Plasmabestandteile entfernt werden, erkennt ein peroxidase-konjugierter Antihumanapolipoprotein B-Antikörper das an der festen Phase gebundene oxidiertes LDL. Nach einer zweiten Inkubation und einem einfachen Waschvorgang, der die mit dem ungebundenen Enzym markierten Antiköper entfernt, wird das gebundene Konjugat durch Reaktion mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) nachgewiesen. Die Reaktion wird durch Zugabe von Säure gestoppt, um einen kolorimetrischen Endpunkt zu liefern, der spektrophotometrisch abgelesen wird.

WARNUNG UND VORSICHTSMAßNAHMEN

- Zum Gebrauch in der in vitro Diagnostik. Nicht für die innere oder äußere Anwendung bei Menschen oder Tieren.
- Der Inhalt dieses Kits und dessen Rückstände dürfen nicht mit Wiederkäuern oder Schweinen in Kontakt kommen.
- Die Stop Solution in diesem Kit enthält 0.5 M H_2SO_4. Befolgen Sie die Routinevorkehrungen beim Umgang mit gefährlichen Chemikalien.
- Alle Patientenproben sollten so behandelt werden, als ob sie Infektionen übertragen könnten.

Warnung! Dieser Kit enthält Reagenzien, die Infektionserreger enthalten können!

Dieser Kit enthält Reagenzien, die aus Komponenten menschlichen Bluts produziert wurden. Die Materialquellen wurden mit einem Immunassay auf das Hepatitis-B-Oberflächenantigen, Antikörper für den Hepatitis-C-virus und auf Antikörper für den HIV-Virus getestet und diese Tests haben sich als negativ erwiesen. Nichtsdestotrotz müssen alle empfohlenen Vorkehrungen für den Umgang mit Blutderivaten beachtet werden. Bitte sehen Sie dazu in der HHS-Veröffentlichung Nr. (CDC) 88-8395 oder entsprechenden lokalen/ nationalen Richtlinien über Sicherheitsabläufe im Labor nach.

ZUSÄTZLICH BENÖTIGTES MATERIAL

- 25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl und 1000 µl Multipipetten (vorzugsweise Mehrfachpipetten für die Zugabe des Enzyme Conjugate 1X lösung, des Substrate TMB und der Stop Solution)
- Becher- und Zylindergläser für die Vorbereitung der Reagenzien
- Doppelt destilliertes Wasser
- Teströhrchen mit Kappen, 3.5 ml
- Mikroplatten-Leser mit 450 nm Filter
- Plattenschüttler (Die empfohlene Geschwindigkeit liegt bei 700–900 Umdrehungen pro Minute, Orbitalbewegung)
- Waschgerät für Mikroplatten
- Geeigneter Mischer

REAGENZIEN

Jeder Mercodia Oxidized LDL ELISA enthält Reagenzien für 96 Brunnen, ausreichend für 40 Proben, zwei Kontrollmessungen und eine Eichkurve im Duplikat. Für eine größere Reihe an Tests sollten Reagenzien, die miteinander vermischt werden, aus Packungen mit verwendet werden gleicher Lot. Nummer. Das Verfallsdatum für den gesamten Kit ist auf dem äußeren Aufkleber angegeben. Die empfohlene Lagertemperatur liegt bei 2–8°C.

Coated Plate Monoklonales anti-oxidiertes LDL der Maus Die unbenutzten Mikrotiterstreifen können in der mit Klebeband versiegelten Originalverpackung bei 2–8°C bis zu zwei Monate lang aufbewahrt werden.	1 Platte	96 Brunnen 8 Brunnen-Strips	Gebrauchsfertig
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 Humanes oxidiertes LDL Gelbfärbung Konzentrationen sind auf den Fläschchen angegeben. Lagerung von rekonstituierten Calibrators: 2-8°C max 1 Woche Lagerung von rekonstituierten Calibrators länger als eine Woche erfordern eine Temperatur von –20°C.	5 Fläschchen	1000 µl	Gefriergetrocknet Geben Sie 1000 µl redstilliertes Wasser pro Fläschchen hinzu.
Calibrator 0 Gelbfärbung	1 Fläschchen	1000 µl	Gebrauchsfertig
Controls (H), (L) Konzentrationen sind auf den Fläschchen angegeben. Lagerung von rekonstituierten Controls: 2-8°C max 1 Woche Lagerung von rekonstituierten Controls länger als eine Woche erfordern eine Temperatur von –20°C.	2 Fläschchen	1000 µl	Gefriergetrocknet Geben Sie 1000 µl redstilliertes Wasser pro Fläschchen hinzu.
Enzyme Conjugate 11X Peroxidasekonjugiertes monoklonales anti-apoB der Maus	1 Fläschchen	1.2 ml	Zubereitung, siehe nachfolgend
Enzyme Conjugate Buffer Blaufärbung	1 Fläschchen	12 ml	Gebrauchsfertig
Assay Buffer Rotfärbung	1 Fläschchen	12 ml	Gebrauchsfertig
Sample Buffer 4X Gelbfärbung *Achtung!* Aufgrund der Lagerung bei 2-8°C kann es zu Ausfällungen kommen. Lassen Sie den Sample Buffer 4X auf Raumtemperatur kommen. Solange schütteln oder verwirbeln, bis sich die Ausfällung wieder gelöst hat. Lagerung nach Verdünnung: 2-8°C max 4 Wochen	1 Flasche	50 ml	Mit 150 ml redestillertem Wasser verdünnen, um die sample buffer 1X Lösung herzustellen
Wash Buffer 21X Lagerung nach Verdünnung: 4 Wochen bei 2-8°C	1 Flasche	50 ml	Mit 1000 ml redestilliertem Wasser die wash buffer1X Lösung herstellen
Substrate TMB Farblose Lösung *Achtung! Lichtempfindlich!*	1 Flasche	22 ml	Gebrauchsfertig
Stop Solution 0.5 M H_2SO_4	1 Fläschchen	7 ml	Gebrauchsfertig

Vorbereitung der enzyme conjugate 1X Lösung

Vorbereitung der benötigten enzyme conjugate 1X Lösung durch mischen von Enzyme Conjugate 11X (1+10) mit Enzyme Conjugate Buffer entsprechend der folgenden Tabelle. Während Sie die enzyme conjugate 1X Lösung für die ganze Platte vorbereiten, schütten Sie den Enzyme Conjugate Buffer komplett in das Fläschchen mit Enzyme Conjugate 11X. Vorsichtig mischen.

Anzahl Streifen	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 Streifen	1 Fläschchen	1 Fläschchen
8 Streifen	700 µl	7.0 ml
6 Streifen	500 µl	5.0 ml
4 Streifen	350 µl	3.5 ml

Lagerung nach Verdünnung: 1 Monat bei 2-8°C.

PROBENGEWINNUNG UND HANDHABUNG

Für den Mercodia oxidized LDL ELISA empfiehlt sich frisches EDTA-Plasma. Heparin-Plasma und Serum können gegebenen Falls auch verwendet werden.

Plasma

Entnehmen Sie das Blut durch Punktieren der Vene in Röhrchen, die EDTA oder Heparin als Antikoagulans enthalten, und trennen Sie die Plasmafraktionen auf. Die Proben können bei –80°C mindestens sechs Monaten gelagert werden. Vermeiden Sie wiederholtes Einfrieren und Auftauen.

Serum

Gewinnen von Blut durch Venenpunktion, gerinnen lassen and das Serums durch Zentrifugieren abtrennen. Die Proben können bei –80°C mindestens sechs Monaten gelagert werden. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen sollte vermieden werden.

VERDÜNNUNG DER PROBEN

Bereiten Sie zwei Röhrchen für jede Patientenprobe vor. Jede Probe muss in zwei Schritten bis zu einer 1/6561 Verdünnung wie folgt verdünnt werden:

1	Patientenprobe	25 µl	
	Sample buffer 1X Lösung	2000 µl	
	Verschließen Sie die Röhrchen mit Kappen, drehen Sie diese dreimal um und mischen Sie diese durch Verwirbelung*		Verdünnung 1/81
2	1/81 Verdünnung der Probe	25 µl	
	Sample buffer 1X Lösung	2000 µl	
	Verschließen Sie die Röhrchen mit Kappen, drehen Sie diese dreimal um und mischen Sie diese durch Verwirbelung*		Verdünnung 1/6561

* Es ist WICHTIG, dass die Proben bei jedem Verdünnungsschritt ordnungsgemäß gemischt werden, bevor sie weiter verwendet werden.

Als Ergebnis dieser Prozedur werden die Proben 1/6561 verdünnt sein.

TESTDURCHFÜHRUNG

Alle Reagenzien und Proben müssen vor deren Anwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Bereiten Sie eine Kalibratorkurve für jeden Test vor.

1. Vorbereitungen von enzyme conjugate 1X Lösung, sample buffer 1X Lösung, wash buffer 1X Lösung und Proben.
2. Ausreichend Coated Plate-Vertiefungen für die Calibrators, Controls und Proben vorbereiten.
3. Jeweils 25 µl der Calibrators, der Controls und der verdünnten Proben in die entsprechend Brunnen pipettieren.
4. 100 µl Assay Buffer in jede Vertiefung geben.
5. Auf einem Plattenschüttler (700-900 rpm) 2 Stunden bei Raumtemperatur (18–25°C) inkubieren.
6. 6mal waschen mit 700 µl wash buffer 1X Lösung pro Vertiefung unter Verwendung eines Platten Waschautomaten mit Überlauf-Waschfunktion. Einwirkzeit während den Waschprozedur sollte vermieden werden.
   Wird manuell gewaschen, bitte folgendermaßen vorgehen: Reaktionsvolumen durch Umdrehen der Mikrotiterplatte über einem Ausgussbecken verwerfen. 350 µl wash buffer 1X Lösung in jede Vertiefung geben. Wasch buffer 1X Lösung verwerfen und mehrmals kräftig gegen saugfähiges Papier schlagen, um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen. 5-mal wiederholen. Längere Einwirkzeiten während dieser Waschprozedur vermeiden.
7. 100 µl enzyme conjugate 1X Lösung in jeden Brunnen geben.
8. Auf dem Plattenschüttler 1 Stunde bei Raumtemperatur (18–25°C) inkubieren.
9. Wie oben beschrieben waschen.
10. 200 µl Substrate TMB zugeben.
11. Mindestens 15 Minuten lang bei Raumtemperatur ohne Schütteln inkubieren.
12. 50 µl Stop Solution hinzugeben. Die Probe 5 Sekunden lang auf den Schüttler stellen, damit die Vermischung sichergestellt ist.
13. Die optische Dichte bei 450 nm ablesen und die Ergebnisse berechnen.
    Die Resultate sollten innerhalb von 30 Minuten abgelesen werden.

Beachten Sie! Um Kontaminationen zwischen dem Konjugat und dem Substrat zu vermeiden, empfehlen wir Ihnen separate Pipetten zu verwenden.

INTERNE QUALITÄTSKONTROLLE

Kommerziell erhältliche Contols und/oder interne Plasma-/Serum-Mischungen mit niedriegen, mittleren und hohen Konzentrationen an oxidiertem LDL sollten routinemäßig in einem Test zusammen mit den Proben gemessen und jeden Tag aufgezeichnet werden. Es empfielt sich die folgenden Daten für jeden Test aufzuzeichnen: Lot. Nummer des Kits; Datum des Ansatzes der Kit-Komponenten; Wert der optischen Dichte der Blanke, der Calibrators und Controls.

BERECHNUNG DER ERGEBNISSE

Computergestützte Berechnung

Es wird emfohlen, die Kalibratorkurve mit Hilfe der Cubic Spline Regression zu berechnen, um die Konzentration an oxidiertem LDL zu ermitteln. Der Calibrator 0 wird in den Berechnungen nicht miteinbezogen. Multiplizieren Sie die Konzentration der Proben mit dem Verdünnungsfaktor (z.B. x 6561).

Manuelle Berechnung

1. Tragen Sie die Absorptionswerte, die für die Calibrators erhalten wurden, gegen die Konzentration an oxidiertem LDL auf einem linear-logarithmisch skalierten Papier auf und erstellen Sie eine Kalibratorkurve. Dabei wird der Calibrator 0 nicht in die Berechnungen miteinbezogen.
2. Lesen Sie die Konzentration der Controls und der Proben aus der Kalibratorkurve ab.
3. Multiplizieren Sie die Konzentration der Controls und der Proben mit dem Verdünnungsfaktor (z.B. × 6561)

Beispiel von Resultaten

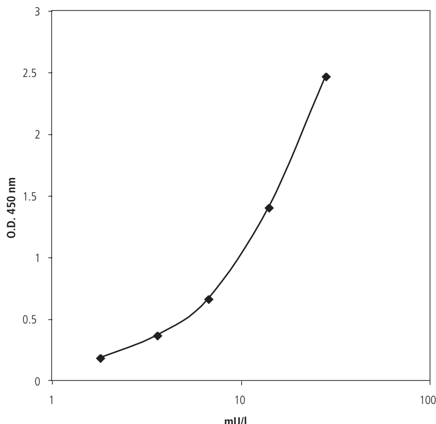
Vertiefungen	Identifikation	A_{450}	Konz. mU/l	U/l**
1A-B	Calibrator 0	0,072		
1C-D	Calibrator 1*	0.185		
1E-F	Calibrator 2*	0.369		
1G-H	Calibrator 3*	0.664		
2A-B	Calibrator 4*	1.405		
2C-D	Calibrator 5*	2.469		
2E-F	Control (H)	1.234	12.2	80.04
2G-H	Control (L)	0.513	5.2	34.12

*Die Konzentration ist auf dem Fläschchen angegeben.

**Ergebnis multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor (× 6561).

Beispiel einer Kalibratorkurve

Nachfolgend wird eine typische Kalibratorkurve gezeigt. Diese sollte nicht zur Berechnung aktueller Testergebnisse benutzt werden!



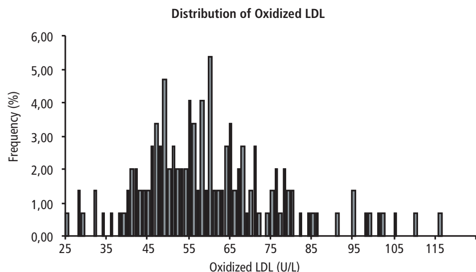
GRENZEN DES VERFAHRENS

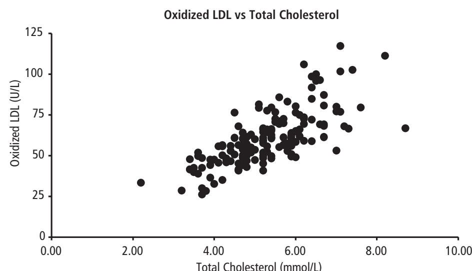
Wie bei allen diagnostischen Tests sollte auch hier eine endgültige klinische Beurteilung nicht auf den Resultaten eines Einzeltests beruhen, sondern erst nach Erhalt der Ergebnisse aller klinischen und Laborbefunde abgegeben werden.

Lipemic, Icteric oder hämolysierte Proben beeinträchtigen den Versuch nicht.

ERWARTETE WERTE

Gute Laborpraxis besagt, dass jedes Labor seinen eigenen Wertebereich ermittelt. Die folgenden Resultate können als Richtlinie gelten, bis das Labor genügend eigene Daten gesammelt hat. Die folgenden Ergebnisse wurden von 149 ambulanten, zufällig ausgewählten Personen aus der Umgebung Stockholms in Schweden ermittelt.





Deutsch

Die folgenden Ergebnisse wurden von 149 ambulanten, zufällig ausgewählten Personen aus der Umgebung Stockholms in Schweden ermittelt.

	Mittelwert	Median	Spannweite
OxLDL (U/l)*	61	59	26–117
Chol/HDL Verhältnis**	4.10	3.90	1.68–7.89

* Beliebige Einheiten. Siehe KALIBRIERUNG.

** Messdaten Cholesterin (mmol/l) und HDL (mmol/l).

Verteilung von oxidiertem LDL und dem Cholesterin/HDL-Verhältnis

Oxidiertes LDL U/l	Cholesterin/HDL Verhältnis	Patient/Gesamt (%)	
	Quartil 1		
Q1 (26–49)	1.68–3.13	22/149	(14.8)
Q2 (50–59)	1.68–3.13	10/149	(6.7)
Q3 (60–69)	1.68–3.13	5/149	(3.4)
Q4 (70–117)	1.68–3.13	0/149	(0.0)
	Quartil 2		
Q1 (26–49)	3.21–3.86	7/149	(4.7)
Q2 (50–59)	3.21–3.86	17/149	(11.4)
Q3 (60–69)	3.21–3.86	10/149	(6.7)
Q4 (70–117)	3.21–3.86	3/149	(2.0)
	Quartil 3		
Q1 (26–49)	3.87–4.79	7/149	(4.7)
Q2 (50–59)	3.87–4.79	11/149	(7.4)
Q3 (60–69)	3.87–4.79	11/149	(7.4)
Q4 (70–117)	3.87–4.79	9/149	(6.0)
	Quartil 4		
Q1 (26–49)	4.80–7.89	1/149	(0.7)
Q2 (50–59)	4.80–7.89	4/149	(2.7)
Q3 (60–69)	4.80–7.89	7/149	(4.7)
Q4 (70–117)	4.80–7.89	25/149	(16.8)

Die folgenden Ergebnisse wurden von 147 ambulanten, zufällig ausgewählten Personen aus der Umgebung Stockholms in Schweden ermittelt.

	Mittelwert	Median	Spannweite
OxLDL (U/l)*	61	59	26–117
LDL/HDL Verhältnis**	2.51	2.36	0.55–5.56

* Beliebige Einheiten. Siehe KALIBRIERUNG.

** Messdaten LDL (mmol/l) und HDL (mmol/l).

Verteilung von oxidiertem LDL und dem LDL/HDL-Verhältnis

Oxidiertes LDL U/l	LDL/HDL Verhältnis	Patient/Gesamt (%)	
	Quartil 1		
Q1 (26–49)	0.55–1.79	19/147	(13.0)
Q2 (50–59)	0.55–1.79	12/147	(8.2)
Q3 (60–69)	0.55–1.79	6/147	(4.1)
Q4 (70–117)	0.55–1.79	0/147	(0.0)
	Quartil 2		
Q1 (26–49)	1.79–2.33	10/147	(6.8)
Q2 (50–59)	1.79–2.33	13/147	(8.8)
Q3 (60–69)	1.79–2.33	10/147	(6.8)
Q4 (70–117)	1.79–2.33	3/147	(2.0)
	Quartil 3		
Q1 (26–49)	2.36–3.08	8/147	(5.4)
Q2 (50–59)	2.36–3.08	11/147	(7.5)
Q3 (60–69)	2.36–3.08	10/147	(6.8)
Q4 (70–117)	2.36–3.08	8/147	(5.4)
	Quartil 4		
Q1 (26–49)	3.09–5.56	0/147	(0.0)
Q2 (50–59)	3.09–5.56	5/147	(3.4)
Q3 (60–69)	3.09–5.56	8/147	(5.4)
Q4 (70–117)	3.09–5.56	24/147	(16.3)

TESTCHARAKTERISIERUNG

Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze liegt bei < 1 mU/l, berechnet in drei Standardabweichungen über dem Calibrator 0.

Wiederfindung

Die Wiederfindung bei der Zugabe beträgt 85–107% (Mittelwert ist 95%)

Präzision

Die Präzision wurde aus drei Proben berechnet, die in 3 bis 8 Wiederholungen bei 20 verschiedenen Fällen gemessen wurden.

Probe	Erhaltener Wert	Variationskoeffizient %		
	mU/l	innerhalb	zwischen	gesamt
1	8.5	5.5	6.2	8.3
2	19	7.3	4.0	8.3
3	32	6.2	4.0	7.4

Verdünnungen

Probe	Verdünnung	Erhaltener Wert mU/l	Erhalten/ Erwartet
		(Assay 1/ Assay 2)	
Probe 1	1:3321		
	1:6642	19.9/18.3	
	1:13284	9.4/9.5	0.94/1.04
Probe 2	1:3321	–	
	1:6642	20.6/20.4	
	1:13284	10.6/9.8	1.02/0.97
Probe 3	1:3321	29.1/32.0	
	1:6642	15.6/15.5	1.07/0.97
	1:13284	7.7/8.0	1.05/1.00
Probe 4	1:3321	21.6/20.2	
	1:6642	10.4/10.4	0.97/1.03
	1:13284	5.9/5.7	1.08/1.12
Probe 5	1:3321	15.9/15.7	
	1:6642	8.1/8.0	1.02/1.02
	1:13284	4.0/4.4	1.02/1.13

Mittelwert Erhaltener/Erwarteter Wert ist 1.03, Spannweite 0.94–1.13.

Kalibrierung

Momentan sind keine internationalen Referenzen verfügbar. Der ELISA für oxdiertes LDL von Mercodia wird in relativen Einheiten gegen eine interne Referenzaufbereitung kalibriert.

HAFTUNG

Die hier angegebenen Leistungsdaten wurden mit Hilfe des oben angegebenen Verfahrens erzielt. Änderungen oder Modifikationen des Verfahren, die nicht von Mercodia AB empfohlen sind, können die Ergebnisse beeinträchtigen. In diesem Fall übernimmt Mercodia AB keine Garantien, inklusive der impliziten Garantie der Handelsfähigkeit und Gebrauchsfähigkeit, wenn nicht ausdrücklich genannt, implizit oder gesetzlich gegeben wurden.

Mercodia AB und seine autorisierten Distributoren sind in diesem Fall nicht haftbar für indirekte Schäden oder Folgeschäden.

UTILISATION PREVUE

Le kit de test Mercodia Oxidized LDL ELISA est destiné à la mesure *in vitro* des quantités des lipoprotéines LDL (lipoprotéines de faible densité) oxydées dans le sérum ou le plasma sanguin de l'homme. Les mesures des quantités de lipoprotéines sont utilisées dans le diagnostic et le traitement des troubles du métabolisme des lipides (par exemple,le diabète sucré), de l'athérosclérose et de diverses affections du foie et des reins.

RÉSUMÉ ET EXPLICATION DU TEST

L'oxydation des lipoprotéines LDL est désormais considérée comme un événement clé du processus biologique d'apparition et d'accélération du développement de la strie graisseuse (lésion athéroscléreuse précoce) [1–5]. Des études expérimentales ont montrés que les LDL deviennent athérogènes lorsqu'elles sont oxydées et que les LDL oxydées sont plus fortement athérogènes que les LDL non oxydées [1–5].

On trouve des LDL oxydées dans les macrophages des lésions athéroscléreuses, mais non dans les artères saines [6]. L'absorption des LDL par les macrophages ne s'effectue pas par l'intermédiairemdes récepteurs B/E aux LDL [7]. Selon de nombreuses études [1–5,8], les LDL, qui sont le principal transporteur du cholestérol sanguin, doivent d'abord être oxydées afin d'être reconnues par les récepteurs "scavenger" (récepteurs des LDL oxydées) des macrophages. La liaison des LDL oxydées aux macrophages est une étape nécessaire ; elle provoque l'accumulation de cholestérol dans les macrophages, qu'elle transforme en cellules spumeuses [8].

Holvoet et ses collègues [9] ont été les premiers à établir clairement que les patients atteints de maladies coronariennes présentaient des taux plasmatiques de LDL oxydées nettement supérieurs à la normale, et que ces valeurs étaient similaires chez les patients présentant une maladie coronarienne stable et chez les patients présentant un syndrome coronarien aigu. Selon cette équipe, ces valeurs sont nettement plus élevées chez les patients présentant un angor stable ou instable, ou un infarctus, que dans un groupe de contrôle composé de sujets, présumés sains, d'âge similaire.

Dans son étude, Holvoet [9-13] mesurait les niveaux plasmatiques de LDL oxydées à l'aide d'un test ELISA concurrent utilisant l'anticorps monoclonal murin mAb-4E6 : celui qu'utilise le kit Mercodia Oxidized LDL ELISA. Cependant, le kit Mercodia est un test ELISA de type "sandwich", dans lequel les puits des plaques de microtitration contiennent une couche de l'anticorps de capture (anticorps mAb-4E6).

Plusieurs études dignes d'intérêt ont été réalisées par des chercheurs cliniciens utilisant les kits Mercodia Oxidized LDL ELISA. Ainsi, Hulthe et Fagerberg [14] ont montré que les niveaux sériques de LDL oxydées étaient corrélés avec l'épaisseur de l'intima et de la média et avec la présence de plaques dans les artères carotide et fémorale, établissant la relation entre l'athérosclérose subclinique et les niveaux sériques de LDL oxydées. Chez des patients présentant un syndrome métabolique, Sigurdardottir, Fagerberg et Hulthe [15] ont observé des niveaux élevés de LDL oxydées; ils ont en outre identifié une association de ces niveaux de LDL avec une faible taille des particules de LDL. Kopprasch *et al*. [16] ont décelé des niveaux sériques élevés de LDL oxydées chez des patients présentant une tolérance au glucose perturbée (impaired glucose tolerance, IGT). Enfin, Duntas, Mantzou et Koutras [17] ont détecté des niveaux sériques de LDL oxydées nettement supérieurs á la normale chez des patients présentant une hypothyroídie clinique.

Lors des conférences "American Heart Association Scientific Sessions" de 2002, Johnston *et al*

[18] ont signalés que les niveaux plasmatiques de LDL oxydées étaient nettement plus élevés chez les patients atteints de maladie coronarienne instable que chez les sujets sains. En revanche, selon une observation d'importance capitale, ils ne relevaient aucune différence significative entre les taux de cholestérol de ces deux groupes de patients. (Références page 93)

PRINCIPE DE LA PROCÉDURE

Une caractéristique du test Mercodia Oxidized LDL ELISA est le dosage immunologique enzymatique à double site, en phase solide. Il repose sur une technique de type "sandwich direct", dans laquelle deux anticorps monoclonaux sont dirigés contre deux déterminants antigéniques distincts du apolipoprotein B oxydées molécule. En phase d'incubation, les molécules de LDL oxydées de l'échantillon réagissent avec les anticorps anti-oxydées LDL fixés aux puits de microtitration. Après rincage, on ajute des anticorps anti-apolipoprotein B humaine conjugués à la peroxydase. Après la deuxiéme incubation, un rincage simple élimine les anticorps marqués non liés. Le conjugué est détecté par réaction avec la 3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). Pour arrêter la réaction, on ajoute de l'acide. Cette solution fournit un point d'évaluation colorimétric, qui sera lu par spectrophotmétri.

AVERTISSEMENTS ET PRECAUTIONS

- Ce kit est réservé à l'utilisation diagnostique *in vitro.* Ne convient pas à l'usage interne ou externe chez les humains ou les animauz.
- Vous devez éviter tout contact entre le contenu ou les résidus de ce kit et les ruminants ou les suidés.
- La Stop Solution fournie contient 0.5 M d'acide sulfurique (H_2SO_4). Respectez les précautions habituelles relatives á l'utilisation de produits chimiques dangereux.
- Tous les spécimens patient doivent être traités comme des échantillons contagieuz.

Attention! Ce kit contient des réactifs qui peuvent s'avérer infectieux!

Ce kit contient des réactifs fabriqués à soumis à des dosages immunologiques visant à détecter l'antigène de surface de l'hépatite B, ainsi que les anticorps du VIH et du virus de l'hépatite C. Ces tests ont donné des résultats négatifs. Toutefois, il convient de respecter toutes les précautions recommandées pour la manipulation des dérivés sanguins. Reportez-vous à la publication HHS n° (CDC) 88-8395 ou aux directives nationales ou locales correspondantes sur les procédures de sécurité en laboratoire.

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

- Pipettes de 25µl, 50, 100, 200 et 1000 µl(pipettes à répétition recommandées pour l'ajout la solution de l'Enzyme Conjugugate, de Substrate TMB et de Stop Solution)
- Béchers et éprouvettes cylindriques pour la préparation des réactifs
- Eau redistillée
- Tubes à essai avec capuchon, 3.5 ml
- Lecteur de microplaques (filtre de 450 nm)
- Agitateur secoueur de plaques (Le régime recommandé est de 700–900 tours par minute, mouvement orbital)
- Dispositif de rinçage de microplaques
- Mélangeur approprié

RÉACTIFS

Chaque kit Mercodia Oxidized LDL ELISA contient suffisamment de réactifs pour 96 puits, soit une quantité permettant de traiter 40 échantillons, deux Controls et une courbe d'étalonnage en double. Pour des séries de dosages plus importantes, mélangez les réactifs de kits portant des numéros de lot identiques. La date de péremption du kit figure sur l'étiquette apposée à l'extérieur. La température de stockage recommandée est 2 à 8°C.

Coated Plate Monoclonal murin anti-oxydées LDL Les puits de microtitration non utilisés peuvent être conservés pendant deux mois entre 2-8°C après les avoir replacés dans leur emballage hermétiquement fermé à l'aide de papier adhésif.	1 plaque Bandes de 8 puits	96 puits	Prête à l'emploi
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 LDL oxydées humaine Code couleur: jaune Conc. indiquée sur l'étiquette. Stockage après reconstitution: 2-8°C pour 1 semaine Pour le stockage et la reconstitution des Calibrators au-delà d'une semaine, conservez-les à –20°C.	5 fioles	1000 µl	Lyophilisé Ajoutez 1000 µl d'eau redistillée par fiole
Calibrator 0 Code couleur: jaune	1 fiole	1000 µl	Prête à l'emploi
Controls (H), (L) Conc. indiquée sur l'étiquette. Stockage après reconstitution: 2-8°C pour 1 semaine Pour le stockage et la reconstitution des Controls au-delà d'une semaine, conservez-les à –20°C.	2 fioles	1000 µl	Lyophilisé Ajoutez 1000 µl d'eau redistillée par fiole
Enzyme Conjugate 11X Peroxidase conjugé monoclonal murin anti-apoB	1 fiole	1.2 ml	A préparer, voir ci-dessous
Enzyme Conjugate Buffer Code couleur: bleu	1 fiole	12 ml	Prête à l'emploi
Assay Buffer Code couleur: rouge	1 fiole	12 ml	Prête à l'emploi
Sample Buffer 4X Code couleur: jaune *Remarque!* Un précipité peut se former aux températures comprises entre 2 et 8°C. Placez Sample Buffer 4X à température ambiante jusqu'à ce que sa température soit égale à celle de la pièce. Secouez-le jusqu'à ce que le précipité soit dissous. Stockage après dilution: 2-8°C pour 4 semaines	1 fiole	50 ml	A diluer avec 150 ml d'eau destillée pour préparer la solution de sample buffer 1X.
Wash Buffer 21X Stockage après dilution: 2-8°C pour 4 semaines	1 fiole	50 ml	Diluez avec 1000 ml d'eau distillée pour préparer la solution de wash buffer 1X
Substrate TMB Solution incolore *Remarque! Cette solution est sensible à la lumière!*	1 fiole	22 ml	Prête à l'emploi
Stop Solution 0.5 M H_2SO_4	1 fiole	7 ml	Prête à l'emploi

Préparation la solution d'Enzyme Conjugate 1X

Préparez le volume de la solution d' Enzyme Conjugate 1X nécessaire en diluant 11X l'Enzyme Conjugate (1+10) dans l'Enzyme Conjugate Buffer, en suivant les indications du table ci-dessous. Lors de la préparation solution d'Enzyme Conjugate 1X pour une plaque entière, transférer tout le tampon d' Enzyme Conjugate Buffer dans le flacon d' Enzyme Conjugate 11X. Mélangez sans agiter.

Nobre de bandes	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 bandes	1 fiole	1 fiole
8 bandes	700 µl	7.0 ml
6 bandes	500 µl	5.0 ml
4 bandes	350 µl	3.5 ml

Stockage après dilution: à température comprise entre 2 et 8°C pendant un mois.

COLLECTE ET MANIPULATION DES SPÉCIMENS

Nous recommandons l'utilisation de plasma EDTA frais avec le kit de test Mercodia Oxidized LDL ELISA. Vous pouvez également utiliser du plasma hépariné ou du sérum.

Plasma

Collectez le sang par ponction veineuse dans des tubes contenant de l'EDTA ou de l'heparine comme anticoagulant et isolez le plasma. Les échantillons peuvent être stockés jusqu' à pedant au moins six mois à une température à –80 °C. Evitez de les congeler et de les décongeler plusieurs fois.

Sérum

Collectez le sang par ponction veineuse, attendez la coagulation, puis isolez le sérum par centrifugation. Les échantillons peuvent être stockés jusqu' à pedant au moins six mois à une température à –80°C. Evitez de les congeler et de les décongeler plusieurs fois.

DILUTION DES ÉCHANTILLONS

Préparez deux tubes pour chaque patient. Chacun des échantillons doit être dilué en deux étapes, de manière à obtenir une dilution finale de 1/6561, selon les critères suivants:

1	Echantillon patient Solution de Sample Buffer 1X Boucher les tubes, les retourner trois fois, puis mélanger le contenu dans un vortex*	25 µl 2000 µl	Dilution 1/81
2	Dilution de l'échantillon 1/81 Solution de Sample Buffer 1X Boucher les tubes, les retourner trois fois, puis mélanger le contenu dans un vortex*	25 µl 2000 µl	Dilution 1/6561

* Il est ESSENTIEL de vérifier que chaque étape de dilution donne lieu à un mélange correct avant de passer à l'étape suivante.

Cette procédure aboutit à une dilution des échantillons de 1/6561.

PROCÉDURE DE TEST

Tous les réactifs et échantillons doivent être mis à température ambiante avant utilisation.
Préparez une courbe d'étalonnage pour chaque dosage.

1 Préparez solution d'Enzyme Conjugate 1X, solution de Sample Buffer 1X, solution de Wash Buffer 1X et d'echantillons.
2 Préparez un nombre suffisant de puits de Coated Plate pour loger les Calibrators, Controls et les échantillons.
3 Pipetez 25 µl de Calibrators,Controls et d'échantillons diluées dans les puits appropriés.
4 Ajoutez 100 µl de Assay Buffer dans chaque puits.
5 Laissez incuber sur un agitateur secoueur de plaques (700-900 rpm) pendant deux heures à température ambiante (entre 18 et 25°C).
6 Lavez 6 fois avec 700 µl solution de Wash Buffer 1X par puit avec un laveur de plaques automatique en utilisant la fonction aspiration verticale. Evitez l'étape de trempage dans la procédure de lavage.
  Ou lavez manuellement :
  Jetez le volume réactionnel en retournant la plaque au-dessus d'un évier. Ajoutez 350 µl solution de Wash Buffer 1X dans chaque puit. Jetez la solution de Wash Buffer 1X, tapez fermement plusieurs fois sur un papier absorbant pour ôter l'excès de liquide. Répétez 5 fois. <u>Evitez les trempages prolongés pendant l'étape de lavage.</u>
7 Ajoutez 100 µl solution d'Enzyme Conjugate 1X dans chaque puits.
8 Laissez incuber sur un agitateur secoueur de plaques pendant une heure à température ambiante (entre 18 et 25°C).
9 Rincez par la méthode décrite plus haut.
10 Ajoutez 200 µl de Substrate TMB.
11 Laissez incuber pendant 15 minutes à température ambiante.
12 Ajoutez 50 µl de Stop Solution. Placez la plaque sur un agitateur secoueur pendant environ 5 secondes, afin que le mélange s'effectue bien.
13 Lisez la densité optique à 450 nm et calculez les résultats.
   La lecture doit être réalisée sous 30 minutes.

Note: Pour éviter les contaminations du conjugué avec le substrat, il est recommandé d'utiliser des pipettes différentes.

CONTRÔLE DE QUALITÉ INTERNE

Les contrôles disponibles dans le commerce ou les mélanges de sérums internes dont la concentration en LDL oxidées est faible, moyenne ou élevée, doivent systématiquement être soumis à un dosage, comme des mélanges de concentration èchantillions, et les résultats doivent être reportés sur un graphique journalier. C'est une bonne pratique pour un laboratoire d'enregistrer les données suivantes pour chaque dosage: numéro de lot du kit, dates de reconstitution des composants, valeurs OD du blanc, des Calibrators et des contrôles.

CALCUL DES RÉSULTATS

Calcul par ordinateur

Pour calculer la concentration en LDL oxydées, réduisez les données d'absorbance des Calibrators, sans Calibrator 0, comparées à la concentration, en appliquant une équation de régression de la spline cubique. Multipliez la concentration des échantillons par le facteur de dilution (par exemple × 6561).

Calcul manuel

1. Placez les points correspondant aux valeurs d'absorbance obtenues pour les Calibrators, sans Calibrator 0, en fonction de la concentration de LDL oxydées sur du papier pour graphi ques lin-logarithmiques et tracez la courbe d'étalonnage.
2. Lisez la concentration des Controls et échantillons à partir de cette courbe.
3. Multipliez la concentration des Controls et des échantillons par le facteur de dilution (par exemple × 6561).

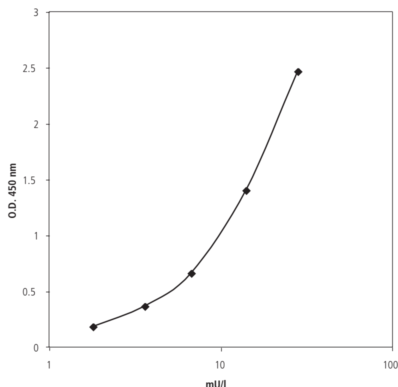
Puits	Identité	A_{450}	Conc. mU/l	U/l**
1A-B	Calibrator 0	0,072		
1C-D	Calibrator 1*	0.185		
1E-F	Calibrator 2*	0.369		
1G-H	Calibrator 3*	0.664		
2A-B	Calibrator 4*	1.405		
2C-D	Calibrator 5*	2.469		
2E-F	Control (H)	1.234	12.2	80.04
2G-H	Control (L)	0.513	5.2	34.12

*Concentration indiquée sur l'etiquette du flacon.

**Résultat multiplié par le facteur de dilution (× 6561).

Exemple de courbe d´étalonnage

La courbe présentée est une courbe d´étalonnage type. Ne l’utilisez pas pour déterminer les résultats des dosages réels.



LIMITES DE LA PROCÉDURE

Comme pour tous les tests de diagnostic, le diagnostic clinique définitif ne doit pas reposer sur les conclusions d’un seul test : il doit être effectué par le médecin après évaluation de tous les résultats cliniques.

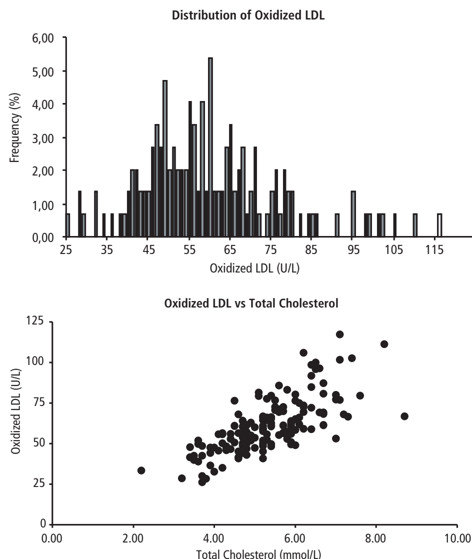
L’hémolyse, l’ictère ou la lipémie n’affectent pas le dosage.

Français

VALEURS MOYENNES

La déontologie incite chaque laboratoire à établir sa propre gamme de valeurs. Les résultats suivants peuvent servir de guide jusqu'à ce que le laboratoire ait rassemblé suffisamment de données provenant de ses propres sources.

Une étude portant sur 149 individus en ambulatoire, sélectionnés au hasard dans la région de Stockholm (Suède), a donné les résultats suivants.



Une étude portant sur 149 individus en ambulatoire, sélectionnés au hasard dans la région de Stockholm (Suède), a donné les résultats suivants.

	Moyenne	médiane	étendue
OxLDL(U/l)*	61	59	26–117
Chol/HDL ratio**	4.10	3.90	1.68–7.89

* Unités arbitraires. Voir étalonnage.

** Mesure du Cholestérol (en mmol/l) et des lipoprotéines HDL (en mmol/l).

Distribution des mesures de LDL oxydées et du ratio Cholestérol/HDL

LDL oxydées U/l	Cholestérol/HDL Ratio	Patient/Total (%)	
	Quartile 1		
Q1 (26–49)	1.68–3.13	22/149	(14.8)
Q2 (50–59)	1.68–3.13	10/149	(6.7)
Q3 (60–69)	1.68–3.13	5/149	(3.4)
Q4 (70–117)	1.68–3.13	0/149	(0.0)
	Quartile 2		
Q1 (26–49)	3.21–3.86	7/149	(4.7)
Q2 (50–59)	3.21–3.86	17/149	(11.4)
Q3 (60–69)	3.21–3.86	10/149	(6.7)
Q4 (70–117)	3.21–3.86	3/149	(2.0)
	Quartile 3		
Q1 (26–49)	3.87–4.79	7/149	(4.7)
Q2 (50–59)	3.87–4.79	11/149	(7.4)
Q3 (60–69)	3.87–4.79	11/149	(7.4)
Q4 (70–117)	3.87–4.79	9/149	(6.0)
	Quartile 4		
Q1 (26–49)	4.80–7.89	1/149	(0.7)
Q2 (50–59)	4.80–7.89	4/149	(2.7)
Q3 (60–69)	4.80–7.89	7/149	(4.7)
Q4 (70–117)	4.80–7.89	25/149	(16.8)

Une étude portant sur 147 individus en ambulatoire, sélectionnés au hasard dans la région de Stockholm (Suède), a donné les résultats suivants.

	Moyenne	médiane	étendue
OxLDL(U/l)*	61	59	26–117
LDL/HDL ratio**	2.51	2.36	0.55–5.56

* Unités arbitraires. Voir étalonnage.
** Mesure des lipoprotéines LDL (en mmol/l) et HDL (en mmol/l).

Distribution des mesures de LDL oxydées et du ratio LDL / HDL

Oxidized LDL U/l	LDL/HDL Ratio	Patient/Total (%)	
	Quartile 1		
Q1 (26–49)	0.55–1.79	19/147	(13.0)
Q2 (50–59)	0.55–1.79	12/147	(8.2)
Q3 (60–69)	0.55–1.79	6/147	(4.1)
Q4 (70–117)	0.55–1.79	0/147	(0.0)
	Quartile 2		
Q1 (26–49)	1.79–2.33	10/147	(6.8)
Q2 (50–59)	1.79–2.33	13/147	(8.8)
Q3 (60–69)	1.79–2.33	10/147	(6.8)
Q4 (70–117)	1.79–2.33	3/147	(2.0)
	Quartile 3		
Q1 (26–49)	2.36–3.08	8/147	(5.4)
Q2 (50–59)	2.36–3.08	11/147	(7.5)
Q3 (60–69)	2.36–3.08	10/147	(6.8)
Q4 (70–117)	2.36–3.08	8/147	(5.4)
	Quartile 4		
Q1 (26–49)	3.09–5.56	0/147	(0.0)
Q2 (50–59)	3.09–5.56	5/147	(3.4)
Q3 (60–69)	3.09–5.56	8/147	(5.4)
Q4 (70–117)	3.09–5.56	24/147	(16.3)

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCES

Limites de détection

La limite de la détection est inférieure à 1 mU/l (trois écarts-type au-dessus du Calibrator 0).

Récupération

Le dosage en retour donne une valeur comprise entre 85 et 107 % (moyenne 95 %)

Précision

Chaque échantillon a été analysé de 3 echantillon en 3–8 exemplaires à 20 occasions différentes.

Echantillon	Valeur moyenne	Coefficient de variation		
	mU/l	% pendant du dosage	% entre le dosage	% total les dosages
1	8.5	5.5	6.2	8.3
2	19	7.3	4.0	8.3
3	32	6.2	4.0	7.4

Dilutions

Echantillon	Dilution	Valeurs obtenues mU/l	Obtenues/ Estimées
		(Assay 1/ Assay 2)	
Echantillon 1	1:3321		
	1:6642	19.9/18.3	
	1:13284	9.4/9.5	0.94/1.04
Echantillon 2	1:3321	–	
	1:6642	20.6/20.4	
	1:13284	10.6/9.8	1.02/0.97
Echantillon 3	1:3321	29.1/32.0	
	1:6642	15.6/15.5	1.07/0.97
	1:13284	7.7/8.0	1.05/1.00
Echantillon 4	1:3321	21.6/20.2	
	1:6642	10.4/10.4	0.97/1.03
	1:13284	5.9/5.7	1.08/1.12
Echantillon 5	1:3321	15.9/15.7	
	1:6642	8.1/8.0	1.02/1.02
	1:13284	4.0/4.4	1.02/1.13

Valeurs moyenne obtenu/estimé est 1.03, étendue 0.94–1.13.

Etalonnage

Aucune référence internationale n’est actuellement disponible le LDL oxidées de Mercodia est calibré avec une préparation de référence faite maison, utilisant des unités arbitraires relatives.

GARANTIE

Les données de performances présentées dans ce document ont été obtenues lors de tests respectant la procédure indiquée. Tout changement ou modification dans la procédure, non recommandé par Mercodia AB, est susceptible d’affecter les résultats. Si la procédure n’est pas respectée, Mercodia AB décline toute responsabilité concernant les garanties exprimées, légales ou implicites, y compris la garantie implicite relative à la qualité marchande et à la conformité d’usage de ce kit.

Mercodia AB et ses distributeurs agréés ne sauront être tenus pour passibles de dommages indirects ou immatériels si la procédure décrite n’est pas respectée.

UTILIZACIÓN PREVISTA

El kit Mercodia Oxidized LDL ELISA está indicado para ser utilizado en la determinación cuantitativa *in vitro* de lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL oxidadas) en suero o plasma de sangre humana. Las determinaciones de lipoproteínas se utilizan en el diagnóstico y tratamiento de trastornos lipídicos (como diabetes mellitus), aterosclerosis y diversas enfermedades hepáticas y renales.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN DE LA PRUEBA

Actualmente se considera que la conversión oxidativa de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDL oxidadas) es un acontecimiento clave en el proceso biológico que inicia y acelera el desarrollo de la lesión aterosclerótica temprana, la estría grasa [1–5].

Estudios experimentales han demostrado que la LDL nativa se vuelve aterogénica cuando se transforma en LDL oxidada y que ésta es más aterogénica que la LDL nativa [1–5]. La LDL oxidada se encuentra en macrófagos derivados de monocitos en lesiones ateroscleróticas, pero no en arterias normales [6]. La incorporación de LDL en los macrófagos no se produce a través del receptor clásico de LDL de Brown/Goldstein [7]. Numerosos estudios [1–5 ,8] han establecido que la LDL, el mayor portador de colesterol en la sangre, primero debe transformarse en LDL oxidada para que pueda ser reconocida por los receptores "scavenger" o de "LDL oxidada" en macrófagos derivados de monocitos. La unión de LDL oxidada a los macrófagos es un paso necesario por el que la LDL oxidada induce la acumulación de colesterol en los macrófagos y, por tanto, los transforma en células espumosas cargadas de lípidos [8].

Holvoet y colaboradores [9] fueron los primeros en demostrar de forma clara que los pacientes con enfermedad coronaria tenían niveles plasmáticos significativamente elevados de LDL oxidada, y que estos niveles circulantes de LDL oxidada eran muy similares en pacientes con enfermedad coronaria estable y en pacientes con síndromes coronarios agudos. Hallaron que los niveles de LDL oxidada eran significativamente mayores en pacientes con angina estable, angina inestable e infarto agudo de miocardio en comparación con sujetos de control de la misma edad y supuestamente sanos.

En las publicaciones de Holvoet [9- 13], los niveles plasmáticos de LDL oxidada se midieron con un ELISA competitivo utilizando un anticuerpo monoclonal murino específico, el mAb-4E6. Debe observarse que el kit ELISA para LDL oxidada de Mercodia utiliza el mismo anticuerpo monoclonal murino específico, mAb-4E6, que Holvoet [9, 10] utilizó en sus ensayos. Sin embargo, el kit de ensayo de Mercodia es un ELISA de captura (también conocido como ELISA "sandwich"), en el que los pocillos de las placas de microtitulación están recubiertos con anticuerpo de captura, mAb-4E6.

Varios estudios han sido publicados por investigadores clínicos que han utilizado kits ELISA para LDL oxidada de Mercodia. Hulthe y Fagerberg [14] demostraron la relación entre la aterosclerosis subclínica y los niveles circulantes de LDL oxidada al mostrar que los niveles de LDL oxidada estaban relacionados con el grosor de la íntima/media y la aparición de placas en las arterias carótida y femoral. Sigurdardottir, Fagerberg y Hulthe [15] hallaron niveles elevados de LDL oxidada en pacientes con síndrome metabólico. Además, hallaron que los niveles elevados de LDL oxidada en pacientes con síndrome metabólico se asociaban con unas particulas de LDL de tamaño pequeño. Kopprasch *et al.* [16] hallaron niveles circulantes elevados de LDL oxidada en sujetos con tolerancia anómala a la glucosa (TAG). Duntas, Mantzou y Koutras [17] hallaron

Español

niveles plasmáticos significativamente elevados de LDL oxidada en pacientes no tratados con hipotiroidismo evidente.

En las sesiones científicas de la Asociatión Cardiológica Americana de 2002, Johnston *et al.* [18] notificaron que los niveles plasmáticos de LDL oxidada fueron sustancialmente más altos en pacientes con enfermedad coronaria inestable, comparado con los controles sanos. Es de destacar que no se hallaron diferencias significativas entre los niveles de colesterol de pacientes con enfermedad coronaria inestable y los controles sanos. (Referencias página 93).

PRINCIPIO DEL PROCEDIMIENTO

Mercodia Oxidized LDL ELISA, es un inmunoensayo de fase sólida de dos emplazamientos. Se basa en la técnica de sandwich directa en la que se dirigen dos anticuerpos monoclonales contra determinantes antigénicos separados de la molécula de apolipoproteina B oxidata. Durante la incubación, el LDL oxidada de la muestra reacciona con los anticuerpos anti- LDL oxidada unidos a al pocillo de microtitulación. Después una limpiza simple, se agrega anticuerpos anti-humano apolipoproteina B conjugados en peroxidasa y se lo deja incubar una segunda vez. Un paso de limpieza simple elimina el anticuerpo etiquetado de enzima sin ligar. El conjugado ligado se detecta por reacción con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacción se detiene añadiendo ácido para dar un punto final colorimétrico que se alcanza espectrofotométricamente.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

- Para uso diagnóstico *in vitro*. No para uso interno o externo en humanes o animales.
- El contenido de este kit y sus residuos no deben dejarse entrar en contacto con animales rumiantes o cerdos.
- La Stop Solution de este kit contiene H_2SO_4 0.5 M. Seguir las precauciones rutinarias para el manejo de productos químicos peligrosos.
- Las muestras de los pacientes deben manipularse como si fueran capaces de transmitir infecciones.

Precaución! Advertencia Este kit contiene reactivos que podrían ser infecciosos.

Este kit contiene reactivos preparados a partir de componentes de sangre humana. Estos componentes han sido analizados por inmunoensayo frente al antígeno de superficie de la hepatitis B, frente a anticuerpos de la hepatitis C y frente a los anticuerpos del VIH, siendo todas estas determinaciones negativas. Sin embargo, deben seguirse todas las precauciones recomendadas para el manejo de derivados de la sangre. Remítase a la publicación del HHS (servicio de salud humana) n.º (CDC) 88-8395 o a las directrices locales y nacionales correspondientes sobre procedimientos de seguridad en laboratorios.

MATERIAL REQUERIDO PERO NO SUMINISTRADO

- Micropipetas de 25 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µ (para la adición disolución de conjugado enzimático, Substrate TMB y Stop Solution se prefieren las pipetas de repetición).
- Cubetas y probetas para preparar los reactivos
- Agua bidestilada
- Tubos de ensayo con tapones, 3.5 ml
- Lector de microplacas (filtro de 450 nm)
- Agitador de placas (La velocidad recomendable es de 700–900 vueltas por minuto, movimiento orbital)
- Lavador de microplacas
- Apropiado dispositivo de mezclar

Español

REACTIVOS

Cada kit de Mercodia Oxidized LDL ELISA contiene reactivos para 96 pocillos, suficientes para 40 muestra y una curva de calibración por duplicado. Para series de ensayos más amplias, mezclar reactivos de paquetes de número de lote idéntico. La fecha de caducidad del kit completo está en el exterior identificada en una etiqueta. La temperatura de conservación recomendada es 2-8°C.

Coated Plate Anticuerpo monoclonal de ratón anti-LDL oxidada Para cintas de microtitración sin utilizar, cerrar la bolsa con cinta adhesiva y conservar a 2–8°C durante ocho semanas.	1 placa	96 pocillos 8 tiras de pocillos	Listor para usar
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 LDL oxidada humana Codificado en amarillo Concentratión indicada la etiqueta del vial Almacenaje después de la reconstitución: 2-8°C durante 1 semana. Para el almacenaje de Calibrators reconstituidos durante más de 1 semana, conservar a –20°C.	5 viales	1000 µl	Liofilizado Añadir 1000 µl de agua bidestilada por vial
Calibrator 0 Codificado en amarillo	1 vial	1000 µl	Listo para usar
Controls (H), (L) Concentratión indicada la etiqueta del vial Almacenaje después de la reconstitución: 2-8°C durante 1 semana. Para el almacenaje de Calibrators reconstituidos durante más de 1 semana, conservar a –20°C.	2 viales	1000 µl	Liofilizado Añadir 1000 µl de agua bidestilada por vial
Enzyme Conjugate 11X Monoclonal de ratón Enzyme Conjugate con peroxidasa anti-apoB	1 vial	1.2 ml	Preparación, ver abajo
Enzyme Conjugate Buffer Codificado en azul	1 vial	12 ml	Listo para usar
Assay Buffer Codificado en rojo	1 vial	12 ml	Listo para usar
Sample Buffer 4X Codificado en amarillo *Atención!* Puede producir un precipitado cuando se conserva a 2-8°C. Dejar que el Sample Buffer 4X alcance de temperatura ambiente. Agitar o pasar por vórtex hasta que se disuelva el precipitado. Almacenaje después de diluir: 2-8°C durante 4 semanas	1 botella	50 ml	Diluir con 150 ml agua bidestilada para preparar la solución de sample buffer 1X.
Wash Buffer 21X Almacenaje después de diluir: 2-8°C durante 4 semanas	1 botella	50 ml	Diluir con 1000 ml agua bidestilada para preparar la solución de wash buffer 1X
Substrate TMB Solución incolora *Atención! Es sensible a la luz!*	1 vial	22 ml	Listo para usar
Stop Solution 0.5 M H_2SO_4	1 vial	7 ml	Listo para usar

Preparación de solución de la enzyme conjugate 1X

Preparar el volumen necessario de solución de la enzyme conjugate 1X por dilución del Enzyme Conjugate 11X (1+10) en Enzyme Conjugate Buffer según la siguinte tabla. Si se usa toda la placa, verter completamente el tampón Enzyme Conjugate Buffer al vial Enzyme Conjugate 11X. Mezclar suavemente.

Número de tiras	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 tiras	1 vial	1 vial
8 tiras	700 µl	7.0 ml
6 tiras	500 µl	5.0 ml
4 tiras	350 µl	3.5 ml

Conservación después de la dilutión: 2-8°C durante un mes.

OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE MUESTRAS

Se recomienda utilizar plasma fresco con EDTA como muestra para el Mercodia Oxidized LDL ELISA. También puede utilizarse plasma con heparina y suero.

Plasma

Recoger la sangre por venipunción en tubos que contienen EDTA o heparina como anticoagulante y separar la fracción de plasma. Las muestras pueden conservarse a –80°C durante al menos seis meses. Evitar la congelación y descongelación de forma repetida.

Suero

Recoger la sangre por venipunción, dejar coagular y separar el suero por centrifugación. Las muestras pueden conservarse a –80°C durante al menos seis meses. Evitar la congelación y descongelación de forma repetida.

DILUCIÓN DE LAS MUESTRAS

Preparar dos tubos por cada muestra de paciente. Cada muestra tiene que diluirse en dos pasos hasta obtener que se haya diluido 1/6561 veces, de la forma siguiente:

1	Muestra del paciente	25 µl	
	Solución de sample buffer 1X	2000 µl	
	Tapar los tubos, invertirlos tres veces y mezclar en vórtex*		Dilución 1/81
2	Dilución 1/81 de la muestra	25 µl	
	Solución de sample buffer 1X	2000 µl	
	Tapar los tubos, invertirlos tres veces y mezclar en vórtex*		Dilución 1/6561

* Es IMPORTANTE asegurarse de que cada paso de dilución se mezcla adecuadamente antes de continuar con el siguiente paso.

Como resultado de este procedimiento, las muestras se diluirán 1/6561.

Español

PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN

Todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente antes de su uso. Preparar una curva de calibración para cada ensayo.

1 Preparar solución de la enzyme conjugate 1X, solución de sample buffer 1X, solución de wash buffer 1X y muestras.
2 Preparar suficientes pocillos de microplaca para los Calibrators, Controls y muestras por duplicad.
3 Pipetear 25 µl de cada Calibrator, Controls y muestra en los pocillos correspondientes.
4 Añadir 100 µl de Assay Buffer a cada pocillo.
5 Incubar en un agitador de placas (700-900 rpm) durante 2 horas a temperatura ambiente (18–25°C).
6 Lavar 6 veces con 700 µl solución de wash buffer 1X por pocillo mediante. Lavador de placas automático con función de sobre-flujo de lavado. No usar el paso de remojo durante el proceso.
O manualmente:
Verter el líquido invirtiendo la microplaca en una pila. Añadir 350 µl solución de wash buffer 1X , golpeando firmemente la placa contra papel absorbente para eliminar todo el líquido en exceso. Repetir 5 veces. <u>Evitar remojo prolongado durante el proceso.</u>
7 Añadir 100 µl solución de la enzyme conjugate 1X a cada pocillo.
8 Incubar en un agitador de placas durante 1 hora a temperatura ambiente (18–25°C).
9 Lavar de la forma descrita anteriormente.
10 Añadir 200 µl de Substrate TMB.
11 Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.
12 Añadir 50 µl de Stop Solution a cada pocillo.
Colocar la placa en un agitador durante aproximadamente 5 segundos para asegurar el mezclado.
13 Leer la densidad óptica a 450 nm y calcular los resultados.
Leer en 30 minutos.

Aviso: Usar pipetas distintas para prevenir contaminación entre conjugado y sustrato.

CONTROL DE CALIDAD INTERNA

Los controles comerciales y/o mezclas de sueros internas con concentraciones de LDL oxidadas bajas,medias y altas, se analizarán de forma rutinaria como muestras y los resultados se representarán día a día. Es una buena práctica de laboratorio registrar los siguientes datos en cada ensayo: número de lote del kit, fechas de reconstitución de los componentes del kit, valores de DO de blanco, Calibrators y Controls.

CÁLCULO DE RESULTADOS

Cálculo computarizado

Para obtener la concentración de LDL oxidada realize la reducción de datos informatizados de la absorbancia para los Calibrators, sin Calibrator 0, frente a la concentración utilizando una regresión spline cúbica. Multiplicar la concentración de las muestras por el factor de dilución (p. ej., × 6561).

Cálculo manual

1. Representar gráficamente los valores de absorbancia obtenidos para los Calibrators, sin Calibrator 0, frente a la concentración de LDL oxidadas en papel lin-log y construir una curva de calibración.
2. Leer la concentración de las muestras a partir de la curva de calibración.
3. Multiplicar la concentración de los Controls y de las muestras por el factor de dilución (p. ej., × 6561).

Pocillos	Identidad	A_{450}	Conc. mU/l	U/l**
1A-B	Calibrator 0	0,072		
1C-D	Calibrator 1*	0.185		
1E-F	Calibrator 2*	0.369		
1G-H	Calibrator 3*	0.664		
2A-B	Calibrator 4*	1.405		
2C-D	Calibrator 5*	2.469		
2E-F	Control (H)	1.234	12.2	80.04
2G-H	Control (L)	0.513	5.2	34.12

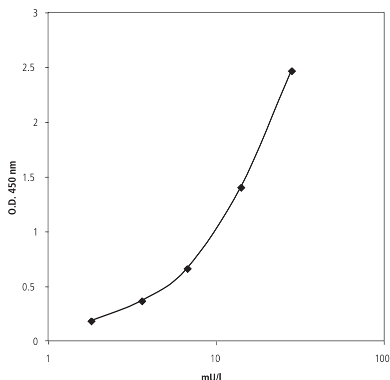
*Concentración indicada en la etiqueta del vial.

**Resultado multiplicado por el factor de dilución (× 6561).

Español

Ejemplo de curva de calibracion

Aquí se presenta una curva de calibración típica. Esta curva no debe utilizarse para verificar resultados de un ensayo.



LÍMITES DEL PROCEDIMIENTO

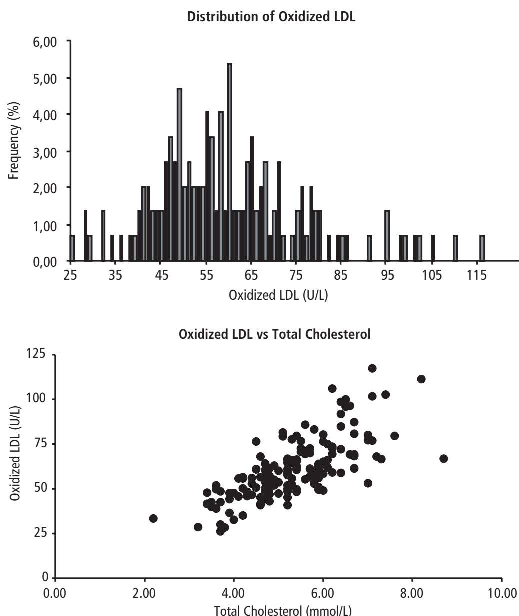
Igual que todas las pruebas diagnósticas, un diagnóstico clínico definitivo no debe estar basado únicamente en los resultados de una sola prueba, sino que el médico debe hacerlo sólo después de haber evaluado todos los datos clínicos.

Las muestras lipémicas, ictéricas o hemolizadas no interfieren en el ensayo.

VALORES ESPERADOS

Una buena práctica de laboratorio dicta que cada laboratorio establezca su propio rango de valores. Los siguientes resultados pueden servir de guía hasta que el laboratorio haya reunido suficientes datos por su cuenta.

Se obtuvieron los siguientes resultados en 149 individuos ambulatorios, seleccionados aleatoriamente en el área de Estocolmo, Suecia



Español

Se obtuvieron los siguientes resultados en 149 individuos ambulatorios, seleccionados aleatoriamente en el área de Estocolmo, Suecia.

	Media	Mediana	Rango
OxLDL(U/l)*	61	59	26–117
Chol/HDL cociente**	4.10	3.90	1.68–7.89

* Unidades arbitrarias. Ver CALIBRACIÓN.

** Datos medidos Colesterol (mmol/l) y HDL (mmol/l).

Distribución de LDL oxidada y cociente Colesterol/HDL

LDL oxidada U/l	Colesterol/HDL Cociente	Patient/Total (%)	
	Quartile 1		
Q1 (26–49)	1.68–3.13	22/149	(14.8)
Q2 (50–59)	1.68–3.13	10/149	(6.7)
Q3 (60–69)	1.68–3.13	5/149	(3.4)
Q4 (70–117)	1.68–3.13	0/149	(0.0)
	Quartile 2		
Q1 (26–49)	3.21–3.86	7/149	(4.7)
Q2 (50–59)	3.21–3.86	17/149	(11.4)
Q3 (60–69)	3.21–3.86	10/149	(6.7)
Q4 (70–117)	3.21–3.86	3/149	(2.0)
	Quartile 3		
Q1 (26–49)	3.87–4.79	7/149	(4.7)
Q2 (50–59)	3.87–4.79	11/149	(7.4)
Q3 (60–69)	3.87–4.79	11/149	(7.4)
Q4 (70–117)	3.87–4.79	9/149	(6.0)
	Quartile 4		
Q1 (26–49)	4.80–7.89	1/149	(0.7)
Q2 (50–59)	4.80–7.89	4/149	(2.7)
Q3 (60–69)	4.80–7.89	7/149	(4.7)
Q4 (70–117)	4.80–7.89	25/149	(16.8)

Se obtuvieron los siguientes resultados en 147 individuos ambulatorios, seleccionados aleatoriamente en el área de Estocolmo, Suecia.

	Media	mediana	rango
OxLDL(U/l)*	61	59	26–117
LDL/HDL conciente**	2.51	2.36	0.55–5.56

* Unidades arbitrarias. Ver CALIBRACIÓN.

** Datos medidos LDL (mmol/l) y HDL (mmol/l).

Distribución de LDL oxidada y cociente LDL/HDL

LDL oxidada U/l	LDL/HDL Cociente	Patient/Total	(%)
	Quartile 1		
Q1 (26–49)	0.55–1.79	19/147	(13.0)
Q2 (50–59)	0.55–1.79	12/147	(8.2)
Q3 (60–69)	0.55–1.79	6/147	(4.1)
Q4 (70–117)	0.55–1.79	0/147	(0.0)
	Quartile 2		
Q1 (26–49)	1.79–2.33	10/147	(6.8)
Q2 (50–59)	1.79–2.33	13/147	(8.8)
Q3 (60–69)	1.79–2.33	10/147	(6.8)
Q4 (70–117)	1.79–2.33	3/147	(2.0)
	Quartile 3		
Q1 (26–49)	2.36–3.08	8/147	(5.4)
Q2 (50–59)	2.36–3.08	11/147	(7.5)
Q3 (60–69)	2.36–3.08	10/147	(6.8)
Q4 (70–117)	2.36–3.08	8/147	(5.4)
	Quartile 4		
Q1 (26–49)	3.09–5.56	0/147	(0.0)
Q2 (50–59)	3.09–5.56	5/147	(3.4)
Q3 (60–69)	3.09–5.56	8/147	(5.4)
Q4 (70–117)	3.09–5.56	24/147	(16.3)

CARACTERÍSTICAS DEL RENDIMIENTO

Límite de detección

El límite de detección es <1 mU/l calculado como tres desviaciones estándar por encima del Calibrator 0

Recuperación

La recuperación a la adición es del 85%–107% (media 95%)

Precisión

Cada muestra se analizó 3 muestra en 3–8 replicados en 20 ocasiones diferentes.

Muestra	Valor siguientes		Coeficiente de variación	
	mU/l	intra-ensayo %	inter-ensayo %	total ensayo %
1	8.5	5.5	6.2	8.3
2	19	7.3	4.0	8.3
3	32	6.2	4.0	7.4

Dilucións

Muestra	Dilución	Valor siguientes mU/l	Siguientes/ Esperados
		(Assay 1/ Assay 2)	
Muestra 1	1:3321		
	1:6642	19.9/18.3	
	1:13284	9.4/9.5	0.94/1.04
Muestra 2	1:3321	–	
	1:6642	20.6/20.4	
	1:13284	10.6/9.8	1.02/0.97
Muestra 3	1:3321	29.1/32.0	
	1:6642	15.6/15.5	1.07/0.97
	1:13284	7.7/8.0	1.05/1.00
Muestra 4	1:3321	21.6/20.2	
	1:6642	10.4/10.4	0.97/1.03
	1:13284	5.9/5.7	1.08/1.12
Muestra 5	1:3321	15.9/15.7	
	1:6642	8.1/8.0	1.02/1.02
	1:13284	4.0/4.4	1.02/1.13

Media siguientes/esperados valor: 1.03, rango 0.94–1.13.

Calibración

Hasta el momento no existe resferencia internacional. El ensayo de Mercodia Oxidized LDL ELISA es calibrado en unidades relativas y arbitrarias contra una preparación de referencia manofacturada por nosotros mismos.

GARANTÍA

Los datos de rendimiento presentados aquí se obtuvieron usando el procedimiento indicado. Cualquier cambio o modificación en el procedimiento, no recomendado por Mercodia AB, puede afectar los resultados, en cuyo caso Mercodia AB declina cualquier responsabilidad y garantía acordada, implícita o explícita, incluso la garantía implícita sobre la comerciabilidad e idoneidad para su uso.

Mercodia AB y sus distribuidores autorizados, en tal caso, no asumirán responsabilidades por daños y perjuicios indirectos o consiguientes.

USO PROPOSTO

Mercodia Oxidized LDL ELISA kit è inteso per essere usato per la misurazione quantitativa *in vitro* di lipoproteine ossidata a bassa densità (LDL ossidato) nel siero o nel plasma del sangue umano. Le misurazioni della lipoproteina sono usate nelle diagnosi e nel trattamento di disordini lipidici (come nel diabete melito), atereosclerosi, e varie malattie del fegato e renali.

RELAZIONE E SPIEGAZIONE DEL TEST

La conversione ossidativa di bassa densità della lipoproteina (LDL) alla bassa densità ossidata delle lipoproteine (LDL ossidato) è attualmente considerata essere un'evento chiave nel processo biologico che comincia e accelera lo sviluppo della precoce lesione atereosclerotica, la riga adiposa [1–5].

Studi sperimentali hanno dimostrato che LDL diventa aterogeno quando è convertito al LDL ossidato, e l' LDL ossidato è più aterogeno del LDL nativo [1–5].

L' LDL ossidato si trova nei macrofagi non accade se non attraverso il classico recettore LDL Brown/Goldstein [7]. Numerosi studi [1–5, 8] hanno stabilito che LDL, il maggior portatore di colesterolo nel sangue, deve essere prima trasformato in LDL ossidato perché possa essere riconosciuto dal "macrofago" o dal "LDL ossidato" recettori dei monoliti derivati macrofagi. Il legante dell' LDL ossidato, ai macrofagi è un passaggio necessario nel quale LDL ossidato induce l'accumulazione di colesterolo nei macrofagi, e di conseguenza trasforma i macrofagi in cellule schiumose cariche di lipide [8].

Holvoet e i suoi colleghi [9] furono i primi a dimostrare chiaramente che i pazienti malati di arteria coronaria hanno aumentato significativamente i livelli del plasma dell' LDL ossidato e che questi livelli circolanti di LDL ossidato erano molto simili in pazienti stabili malati di arteria coronaria e in pazienti con sindrome coronaria acuta. Essi trovarono i risultati dell' LDL ossidato del plasma essere significativamente molto più alti nei pazienti con un'angina stabile, l'angina instabile e acuto infarcimento miocardiaco quando confrontato all'età selezionata, presumibilmente soggetti controllati e sani.

Nella pubblicazione di Holvoet [9-13] i livelli di plasma LDL ossidato furono misurati da una ELISA competitiva utilizzando un anticorpo specifico murino monoclinale, mAb-4E6. Dovrebbe essere di rilievo che il kit Mercodia Ossidato LDL ELISA usa lo stesso specifico anticorpo murino monoclinale, mAb-4E6, che Holvoet [9,10] usava nelle sue analisi. Comunque, il kit analisi Mercodia è una cattura ELISA conosciuta anche come un "sandwich" ELISA), nel quale i pozzetti microtiter delle piastre sono ricoperte con l'anticorpo cattura mAb-4E6.

Diversi studi autorevoli sono stati riportati dai ricercatori clinici che hanno usato i kits Mercodia ossidato LDL e ELISA. Hulthe e Fagerberg [14] dimostrarono la relazione tra aterosclerosi subclinica e i livelli di LDL ossidato circolante dimostrando attraverso i livelli di LDL ossidato erano correlati allo spessore di media-intim e placche impreviste nelle arterie femorali e carotidee. Sigurdadottir, Fagerberg e Hulthe [15] trovarono elevati livelli di LDL ossidato in pazienti con sindrome metabolico. In aggiunta, trovarono che elevati livelli di LDL ossidato in paziente con sindrome metabolico erano associatocon particelle di piccola taglia di LDL Kopprasch *et al.* [16] trovarono elevato livelli di LDL ossidatocircolante in soggetti con una ridotta tolleranza al glucosio (IGT). E Duntas, Mnatzou e Koutras [17] trovarono significativamente elevati livelli di plasma LDL ossidato in paziente non trattati con manifesto ipotiroidisimo.

Alla riunione dell'Associazione Americana del Cuore 2002, Johnston *et al.* [18] relazionarono

Italiano

che i livelli del plasma del LDL ossidato erano sostanzialmente più alti in pazienti con problemi di arteria coronaria instabile in confronto ai controlli sani. Molto importante, non c'era una differenza significativa tra i livelli di colesterolo nei pazienti con problemi instabili di arteria coronaria i controlli sani. (Riferimenti pagina 93).

PRINCIPIO DI PROCEDURA

Mercodia Oxidized LDL ELISA, è una fase concreta dell'immunoanalisi Enzyme due-sito.E' basata sulla tecnica diretta sandwich nella quale due anticorpi monoclonali sono diretti contro determinanti antigenici separati sulla molecula apolipoproteina B ossidato. Durante l'incubazione la LDL ossidato nella reazione del campione con anticorpi anti LDL ossidato diretto microtitrazione nei pozzetti. Dopo il lavaggio, gli anticorpi anti-umano apolipoproteina B perossidasi conjugata sono aggiunti e dopo la seconda incubazione e un semplice lavaggio che rimuove indirettamente gli anticorpi degli enzimi marcati. Il Conjugate diretto è scoperto dalla reazione con 3,3',5,5' – tetrametibenzidine (TMB). La reazione è fermata aggiungendo acido per dare una posizione estrema colorimetrica che è letta spettrometricamente.

PREACAUZIONI E AVVISI

- Per l'uso diagnostico *in vitro*. Non per uso interno o esterno nell'uomo o negli animali.
- I contenuti di questo kit e i suoi residui non devono essere ammessi al contatto con animali ruminanti o suini.
- La Stop Solution in questo kit contiene 0.5 M H_2SO_4. Seguire le precauzioni quotidiane di routine per maneggiare sostanze chimiche pericolose.
- T utti i pazienti presi come campione potrebbero essere trattati come capaci di trasmetter infezioni.

Avvertimenti! Questo kit contiene reagenti che possono essere infettivi!

Questo Kit contiene reagenti prodotti da componenti con sangue umano. L' origine dei materiali è stata analizzata da analisi di immunità per l'epatite B della superficie dell'antigene, anticorpi per il virus dell' epatite C virus e per anticorpi per il virus dell' HIV e sono stati trovati negativi. Tuttavia, tutte le precauzioni raccomandate per la manipolazione per i derivati del sangue devono essere osservati. Si veda il riferimento alla Pubblicazione HHS no. (CDC) 88-8395 o le guide corrispondenti a ciascuna nazione/località sulle procedure di sicurezza in laboratorio.

MATERIALI RICHIESTI MA NON INCLUSI

- Pipette for 25µl, 50, 100, 200, e 1000 µl(riutilizza le pipette in dotazione per l'aggiunta il tampone per l'enzima coniugato, Substrate TMB e Stop Solution)
- Beakers e cilindri per la preparazione di reagenti
- Acqua ridistillata
- Tubi per test con tappi, 3.5 ml
- Lettore micro piastra (450nm filtro)
- Piastra dello shaker (La velocità raccomandata è di 700–900 giri/minuto, movimento orbitale)
- Micro piastra piano di lavaggio
- Apropriate dispositivo di miscelazione

Italiano

REAGENTI

Ogni kit Mercodia Oxidized LDL ELISA contiene reagenti per 96 prove, sufficienti per 40 campioni e una calibratura curva in duplicato. Per diverse serie di analisi, usare reagenti provenienti da scatole portanti identici numeri di lotto. La data di scadenza del kit completo è stabilita sull'etichetta all'esterno. Si raccomanda di conservare ad una temperatura di 2–8°C.

Coated Plate topo monoclonale anti LDL ossidato Per le strisce di microtitolazione non utilizzati, sigillare nuovamente la confezione con nastro adesivo e conservare a 2–8°C per otto settimane.	1 piastra 8 strips de pozzetti	96 pozzetti	Pronti per l'uso
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 ossidato LDL umano Giallo colore codificato Concentrazione indicata sull'etichetta della fiala Conservare dopo la ricostituzione: 2-8 °C per 4 settimana Per la conservazione del Calibrator ricostituito per periodi superiori ad una settimana, conservare a –20°C.	5 fiale	1000 µl	Liofilizzato Aggiungere 1000 µl acqua ridistilata per fiala
Calibrator 0 Giallo colore codificato	1 fiala	1000 µl	Pronti per l'uso
Controls (H), (L) Concentrazione indicata sull'etichetta della fiala Conservare dopo la ricostituzione: 2-8 °C per 4 settimana Per la conservazione del Calibrator ricostituito per periodi superiori ad una settimana, conservare a –20°C.	2 viales	1000 µl	Liofilizzato Aggiungere 1000 µl acqua ridistilata per fiala
Enzyme Conjugate11X Peroxidasi Conjugate topo monoclonale anti-apoB	1 fiala	1.2 ml	Per la preparazione vedi sotto
Enzyme Conjugate Buffer Blu colore codificato	1 fiala	12 ml	Pronti per l'uso
Assay Buffer Rosso colore codificato	1 fiala	12 ml	Pronti per l'uso
Sample Buffer 4X Giallo colore codificato *Nota!* Precipitato può servie quando conservato a 2-8°C. Lasciare che Sample Buffer 4X raggiunga la temperatura ambiente. Agitare o mescolare forte fino a che il precipitato venga dissolto. Conservazione dopo la diluizione: 2-8 °C per 4 settimane	1 bottiglia	50 ml	Diluir con 150 ml d'aqua ridistillata per fare diluenti la soluzione de sample buffer 1X.
Wash Buffer 21X Conservazione dopo la diluizione: 2-8 °C per 4 settimane	1 bottiglia	50 ml	Diluir con 1000 ml d'aqua ridistillata per fare diluenti la soluzione de wash buffer 1X.
Substrate TMB Solución incolore *Nota! Sensibile alla luce!*	1 fiala	22 ml	Pronti per l'uso
Stop Solution 0.5 M H_2SO_4	1 fiala	7 ml	Pronti per l'uso

Preparazione di soluzione della enzyme conjugate 1X

Preparare la quantitá necessaria soluzione della enzyme conjugate 1X on la diluzione dell' Enzyme Conjugate 11X (1+10) nel Enzyme Conjugate Buffer in base alla tabella sottostante. Quando si prepara la soluzione enzyme conjugate 1X per tutta la piastra, versare tutto il tampone Enzyme Conjugate Buffer nella fiala dell' Enzyme Conjugate 11X. Mescolare lievemente.

Numero de strisce	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 strisce	1 fiala	1 fiala
8 strisce	700 µl	7.0 ml
6 strisce	500 µl	5.0 ml
4 strisce	350 µl	3.5 ml

Conservazione dopo la diluzione: 2-8°C per uno mese.

LA RACCOLTA E IL TRATTAMENTO DEL MODELLO

L'uso consigliato del modello del Mercodia Oxidized LDL ELISA è plasma- EDTA fresco. Il plasma-eparina e il siero possono essere usati.

Plasma

Prelevare il sangue direttamente in vena con provette contenenti EDTA o eparina come anticoagulante, e separare la frazione del plasma. I campioni possono essere conservati a –80°C per almeno sei mesi. Evitate di ripetere il congelamento o lo scongelamento.

Siero

Il prelievo in vena di sangue, permette di coagulare, e separare il siero con la centrifugazione. I campioni possono essere conservati a –80°C per almeno sei mesi. Evitare di ripetere il congelamento e lo scongelamento.

Italiano

DILUIZIONE DEI CAMPIONI

Preparare due provette per ciascun paziente campione.Ogni campione deve essere diluito in due tempi per una diluizione finale di 1/6561 come segue:

1	Paziente campione Soluzione de sample buffer 1X Incapsulate le provette , capovolgetele tre volte e miscelatele con il Vortex*	25 µl 2000 µl	Diluizione 1/81
2	1/81 diluizione del campione Soluzione de sample buffer 1X Incapsulare le provette, capovolgerle tre volte e miscelatele con il Vortex*	25 µl 2000 µl	Diluizione 1/6561

* E' importante assicurarsi che ogni fase di diluizione sia propriamente miscelata prima di ulteriori usi.

Como risultato di questa procedura i campioni saranno diluiti 1/6561.

PROCEDURA DEL TEST

Tutti i reagenti e i campioni devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'uso. Preparare una calibratura curva per ciascuna serie di anilisi.

1 Preparare di soluzione de enzyme conjugate 1X, di soluzione de sample buffer 1X, di soluzione de wash buffer 1X e campioni.
2 Preparare sufficienti pozzetti nelle micropiastre a comporre Calibrators, Controls e campioni.
3 Pipette 25 µl per ogni Calibrators, Controls e campioni in appropriati pozzetti.
4 Aggiungere 100 µl al Assay Buffer per ogni pozzetto.
5 Mettere in incubatrice in una piastra shaker (700-900 rpm) per 2 ora a temperatura am biente (18–25°C).
6 Lavare 6 volte con 700 µl di soluzione de wash buffer 1X per pozzetto usando un lavatore automatico per piastre con la funzione traboccare-lavare. Nella procedura di lavaggio non utilizzare la funzione immersione.
   O manualmente,
   Eliminare il volume di reazione capovolgendo la micropiastra su un lavabo. Aggiungere 350 µl di soluzione de wash buffer 1X ad ogni pozzetto. Eliminare la soluzione de wash buffer 1X, sbattere con forza diverse volte contro carta assorbente per rimuovere il liquido in eccesso. Ripetere 5 volte. Evitare prolungate pause di immersione durante la procedura di lavaggio.
7 Aggiungere 100 µl di soluzione della enzyme conjugate 1X per ogni pozzetto.
8 Mettere in incubatrice in una piastra shaker per 1 ora a temperatura ambiente (18–25°C).
9 Lavare come descritto sopra.
10 Aggiungere 200 µl Substrate TMB.
11 Mettere in incubatrice per 15 minuti a temperatura ambiente.
12 Aggiungere 50 µl di Stop Solution ad ogni pozzetto. Mettere la piastra in uno shaker per approssimativamente per 5 secondi per garantire lamiscelazione.
13 Leggere l'assorbività a 450 nm e calcolare i risultati. Leggere entro 30 minuti.

Nota! Per evitare qualsiasi contaminazione tra coniugato e substrato devono essere usate pipette distinte.

CONTROLLO DI QUALITA’ INTERNO

I controlli commerciali tale e/o il siero interno proveniente da diversi donatori con basse, intermedie e alte concentrazione di C-peptide dovrebbero essere analizzate periodicamente come se fossero esterne, e i risultati tracciati di giorno in giorno. E’ buona norma di un laboratorio registrare i seguenti dati per ciascuna analisi: un certo numero di kit, una ricostituzione dei dati e dei componenti del kit, i valori di OD per il modulo, Calibrators e controlli.

IL CALCOLO DEI RISULTATI

Calcolo computerizzato

La riduzione dei dati computerizzati dell’assorbenza per le Calibrator, senza Calibrator 0, verso la concentrazione usando un regressione cubica flessibile potrebbe essere effettuata per ottenere la concentrazione di LDL Ossidato. Moltiplicare la concentrazione dei campioni con un fattore di diluizione (e.g. × 6561).

Il Calcolo manuale

1. Tracciare i valori di assorbenza ottenuti per le Calibrator, senza Calibrator 0, contro la concentrazione di LDL ossidato in un registro e formula (lin-log) una calibratura curva.
2. Leggere la concentrazione dei campioni dalla calibratura curva. La calibratura curva può anche essere calcolata usando un algoritmo liscio cubico flessibile.
3. Moltiplicare la concentrazione dei Controls e dei campioni con il fattore di diluizione (e.g. × 6561).

Risultati ottenuti

Pozzetti	Identità	A_{450}	Conc. mU/l	U/l**
1A-B	Calibrator 0	0,072		
1C-D	Calibrator 1*	0.185		
1E-F	Calibrator 2*	0.369		
1G-H	Calibrator 3*	0.664		
2A-B	Calibrator 4*	1.405		
2C-D	Calibrator 5*	2.469		
2E-F	Control (H)	1.234	12.2	80.04
2G-H	Control (L)	0.513	5.2	34.12

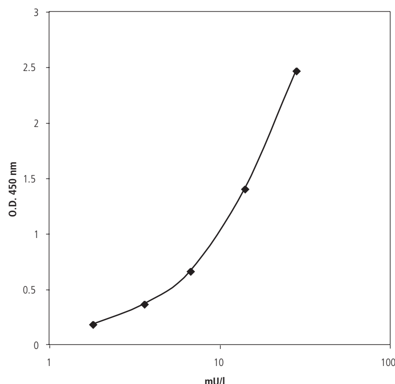
*Concentrazione indicata sull’etichetta della fiala.

**Il risultato viene moltiplicato per il fattore di diluizione (× 6561).

Italiano

Esempio di una calibratura curva

Una calibratura rappresentativa è mostrata qui. Non usare questa curva per determinare i risultati attuali delle analisi.



LIMITAZIONI DELLA PROCEDURA

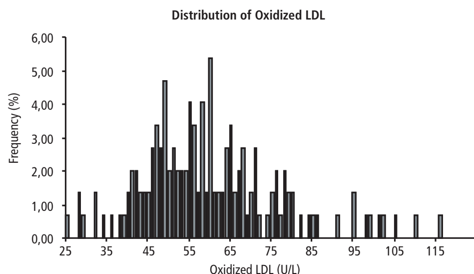
Come tutti i test diagnostici, una diagnosi clinica definitiva non dovrebbe essere basata sui risultati di un singolo test, ma dovrebbe essere fatto medico dopo averne valutate le conclusioni cliniche.

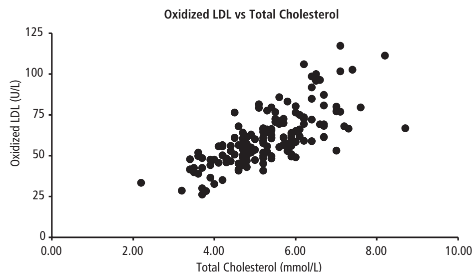
Grossolanamente campioni lipemic, itterico o hemolysed non interferiscono nell'analisi.

VALORI PREVISTI

E’ buona norma e pratica di ogni laboratorio stabilire una serie del tutto sua di presunti valori. I seguenti risultati potrebbero servire come guida fino a che il laboratorio abbia raccolto dati sufficienti del tutto suoi.

I seguenti risultati sono stati ottenuti da 149 individui selezionati casualmente in laboratorio nella zona di Stoccolma, Svezia.





Italiano

I seguenti risultati sono stati ottenuti da 149 individui selezionati casualmente in laboratorio nella zona di Stoccolma, Svezia.

	Media	mediana	serie
OxLDL (U/l)*	61	59	26–117
Col/HDL rapporto**	4.10	3.90	1.68–7.89

* Unità arbitrarie. Vedi calibratura.

** Dati del Colesterolo valutati (mmol/l) e HDL (mmo/l).

Rapporto della distribuzione dell' LDL Ossidato e del Colesterolo/HDL

LDL Ossidato U/l	Colesterolo/HDL rapporto	Patient/Total (%)	
	Quartile 1		
Q1 (26–49)	1.68–3.13	22/149	(14.8)
Q2 (50–59)	1.68–3.13	10/149	(6.7)
Q3 (60–69)	1.68–3.13	5/149	(3.4)
Q4 (70–117)	1.68–3.13	0/149	(0.0)
	Quartile 2		
Q1 (26–49)	3.21–3.86	7/149	(4.7)
Q2 (50–59)	3.21–3.86	17/149	(11.4)
Q3 (60–69)	3.21–3.86	10/149	(6.7)
Q4 (70–117)	3.21–3.86	3/149	(2.0)
	Quartile 3		
Q1 (26–49)	3.87–4.79	7/149	(4.7)
Q2 (50–59)	3.87–4.79	11/149	(7.4)
Q3 (60–69)	3.87–4.79	11/149	(7.4)
Q4 (70–117)	3.87–4.79	9/149	(6.0)
	Quartile 4		
Q1 (26–49)	4.80–7.89	1/149	(0.7)
Q2 (50–59)	4.80–7.89	4/149	(2.7)
Q3 (60–69)	4.80–7.89	7/149	(4.7)
Q4 (70–117)	4.80–7.89	25/149	(6.8)

I seguenti risultati sono stati ottenuti da 147 individui selezionati casualmente in laboratorio nella zona di Stoccolma, Svezia.

	Media	mediana	serie
OxLDL (U/l)*	61	59	26–117
LDL/HDL rapporto**	2.51	2.36	0.55–5.56

* Unità arbitrarie. Vedi calibratura.

** Dati del LDL valutati (mmol/l) e HDL (mmo/l).

Rapporto della distribuzione dell' LDL Ossidato e del LDL/HDL

LDL ossidato U/l	LDL/HDL rapporto	Patient/Total	(%)
	Quartile 1		
Q1 (26–49)	0.55–1.79	19/147	(13.0)
Q2 (50–59)	0.55–1.79	12/147	(8.2)
Q3 (60–69)	0.55–1.79	6/147	(4.1)
Q4 (70–117)	0.55–1.79	0/147	(0.0)
	Quartile 2		
Q1 (26–49)	1.79–2.33	10/147	(6.8)
Q2 (50–59)	1.79–2.33	13/147	(8.8)
Q3 (60–69)	1.79–2.33	10/147	(6.8)
Q4 (70–117)	1.79–2.33	3/147	(2.0)
	Quartile 3		
Q1 (26–49)	2.36–3.08	8/147	(5.4)
Q2 (50–59)	2.36–3.08	11/147	(7.5)
Q3 (60–69)	2.36–3.08	10/147	(6.8)
Q4 (70–117)	2.36–3.08	8/147	(5.4)
	Quartile 4		
Q1 (26–49)	3.09–5.56	0/147	(0.0)
Q2 (50–59)	3.09–5.56	5/147	(3.4)
Q3 (60–69)	3.09–5.56	8/147	(5.4)
Q4 (70–117)	3.09–5.56	24/147	(16.3)

CARATTERISTICHE E ESECUZIONE

Il limite della scoperta

Il limite della scoperta è <1mU/l calcolato come tre deviazioni standard sopra della Calibrator 0.

Riacquisto

Il riacquisto sull'aggiunta è 85–107 % (significa 95%)

Precisione

L'esattezza è stata calcolata dai tre campioni analizzati ripetutamente, 3–8 volte in 20 diverse circostanze.

Campioni	Valore principale	Coefficiente di variazione		
	mU/l	Nell' analisi %	Fra analisi %	totale analisi %
1	8.5	5.5	6.2	8.3
2	19	7.3	4.0	8.3
3	32	6.2	4.0	7.4

Diluizione

Campioni	Diluizione	Valore principale mU/l	Principale/ Prevesti
		(Essere 1/ Essere 2)	
Campioni 1	1:3321		
	1:6642	19.9/18.3	
	1:13284	9.4/9.5	0.94/1.04
Campioni 2	1:3321	–	
	1:6642	20.6/20.4	
	1:13284	10.6/9.8	1.02/0.97
Campioni 3	1:3321	29.1/32.0	
	1:6642	15.6/15.5	1.07/0.97
	1:13284	7.7/8.0	1.05/1.00
Campioni 4	1:3321	21.6/20.2	
	1:6642	10.4/10.4	0.97/1.03
	1:13284	5.9/5.7	1.08/1.12
Campioni 5	1:3321	15.9/15.7	
	1:6642	8.1/8.0	1.02/1.02
	1:13284	4.0/4.4	1.02/1.13

Media principale/ prevesti valori é1.03, serie 0.94–1.13.

Calibratura

Nessun riferimento internazionale è disponibile al momento. Il Mercodia Oxidized LDL ELISA è calibrato in determinate unità arbitrarie contro una preparazione di riferimento interna.

GARANZIA

I dati dei rendimenti presentati qui sono stati ottenuti usando le procedure indicate. Qualsiasi cambiamento o modifica nella procedura non raccomandata da Mercodia AB possono avere effetti su i risultati, nel caso in cui Mercodia rinuncia al diritto tutte le garanzie espresse, implicite o fissate, inclusa la garanzia implicita per l'uso commerciale e appropriato.

Mercodia AB e i suoi distributori autorizzati, in tal caso, non sarà soggetto a danni indiretti o consequenziali.

TILSIGTET ANVENDELSE

Mercodia Oxidized LDL ELISA er beregnet til kvantitativ *in vitro*-måling af iltede lavdensitetslipoproteiner (oxideret LDL) i humant serum eller plasma. Målinger af lipoproteiner bruges ved diagnosticering og behandling af problemer med lipidmetabolismen (f.eks. diabetes mellitus), åreforkalkning og forskellige lever- og nyresygdomme.

OVERSIGT OG FORKLARING AF ANALYSEN

Oxidationskonverteringen af lavdensitets-lipoproteiner (LDL) til iltede lavdensitets-lipoproteiner (iltede LDL) anses nu for at være en afgørende hændelse i den biologiske proces, der starter og fremskynder udviklingen af tidlige aterosklerotiske læsioner, fedtstriber [1–5].

Forsøg har vist, at nativ LDL bliver atherogenetisk, når det omdannes til oxideret LDL, og at oxideret LDL er mere atherogenetisk end nativ LDL[1–5]. Oxideret LDL findes i monocyt-afledte makrofager i aterosklerotiske læsioner, men ikke i normaler arterier [6]. Optagelsen af LDL i makrofager finder ikke sted ved hjælp af den klassiske Brown/Goldstein-LDL-receptor [7]. Talrige undersøgelser [1–5,8] har påvist, at LDL, der er den vigtigste transportør af blodkolesterol, først skal omdannes til oxideret LDL, så det kan genkendes af scavenger- eller oxideret LDL-receptorerne på monocyt-afledte makrofager. Bindingen af oxideret LDL til makrofager er et nødvendigt trin, hvor oxideret LDL fremkalder kolesterolakkumulering i makrofager, og dermed omdannes makrofagerne til lipidfyldte skummende celler [8].

Holvoet og hans kolleger [9] var de første, der klart påviste, at patienter med koronararteriesygdomme har betydeligt forhøjede oxidere LDL-koncentrationer i plasma, og at disse cirkulerede oxideret LDL-koncentrationer svarede meget til patienter med en stabil koronararteriesygdom og patienter med akutte koronarsyndromer. De viste, at oxideret LDL-resultater i plasma var betydeligt højere hos patienter med stabil angina pectoris, ustabil angina pectoris og akut myokardieinfarkt ved sammenligning med tilsyneladende sunde kontrolpersoner med samme alder.

I Holvoets udgivelser [9-13] blev oxideret LDL-koncentrationerne i plasma målt med en kompetitiv ELISA ved hjælp af et specifikt monoklonalt antistof fra mus, mAb-4E6. Det skal bemærkes, at der i Mercodia Oxidized LDL ELISA-kit anvendes det samme specifikke monoklonale antistof fra mus, mAb-4E6, som Holvoet [9,10] har anvendt i sine analyser. Men Mercodia-kittet er en capture-ELISA (også kaldet en ”sandwich-ELISA”), hvor brøndene på mikrotitreringsplader er belagt med opsamlingsantistoffet, mAb-4E6.

Der er gennemført adskillige bemærkelsesværdige undersøgelser af kliniske forskere, der har brugt Mercodia Oxidized LDL ELISA-kittet. Hulthe og Fagerberg [14] påviste sammenhængen mellem subklinisk åreforkalkning og cirkulerende oxideret LDL-koncentrationer ved at vise, at oxideret LDL-koncentrationer er relateret til intima-media-tykkelsen og belægningen i halspulsåren og arteria femoralis. Sigurdardottir, Fagerberg og Hulthe [15] påviste forhøjede oxideret LDL-koncentrationer hos patienter med metabolisk syndrom. Desuden påviste de, at forhøjede oxideret LDL-koncentrationer hos patienter med metabolisk syndrom var knyttet til små LDL-partikler. Kopprasch *et al*. [16] påviste forhøjede koncentrationer af cirkulerende oxideret LDL hos individer med nedsat sukkerfølsomhed (impaired glucose tolerance – IGT). Og Duntas, Mantzou og Koutras [17] påviste betydeligt forhøjede oxideret LDL-plasmakoncentrationer hos patienter med ubehandlet åbenbar hypothyreose.

Ved American Heart Association Scientific Sessions 2002 rapporterede Johnston *et al*. [18], at plasmakoncentrationer af oxideret LDL var væsentligt højere hos patienter med ustabil

koronararteriesygdom sammenlignet med sunde kontrolpersoner. Det vigtigste var, at der ikke var en betydelig forskel mellem kolesterolniveauerne hos patienter med ustabil koronararteriesygdom og sunde kontrolpersoner.

PRINCIP FOR PROCEDUREN

Mercodia Oxidized LDL ELISA er en tosidet solid phase-enzymimmunanalyse. Den er baseret på den direkte sandwich-teknik, hvor to monoklonale antistoffer rettes mod separate antigene determinanter på oxideret apolipoprotein B-molekylet. Under inkubation reagerer oxideret LDL i prøven med anti-oxideret LDL-antistofferne, der er bundet til mikrotitersbrønden. Efter vaskning tilsaettes de peroxidase-konjugerede anti-human-apolipoprotein B -antistoffer, og efter den anden inkubation og en enkel vaskning, der fjerner ubundet enzym-maerket antistof, registreres det bundne konjugat ved reaktion med 3,3',5,5'-tetramethylbenzidin (TMB). Reaktionen stoppes ved at tilsætte syre for at give et kolorimetrisk endepunkt, der aflæses spektrofotometrisk.

ADVARSLER OG FORHOLDSREGLER

- Til *in vitro*-diagnosticering. Ikke til intern eller ekstern brug for mennesker eller dyr.
- Indholdet af dette kit samt rester deraf må ikke komme i kontakt med drøvtyggende dyr eller svin.
- Stop Solution i dette kit indeholder 0.5 M H_2SO_4. Overhold almindelige forholdsregler for håndtering af farlige kemikalier.
- Alle patientprøver skal håndteres som potentielt smittefarlige.

Advarsel! Kittet indeholder potentielt smittefarlige reagenser!

Kittet indeholder reagenser, der er fremstillet af humane blodkomponenter. Kildematerialet er blevet testet ved immunanalyse for hepatitis B-overfladeantigen, antistoffer mod hepatitis C virus og antistoffer mod HIV-virus og er fundet negativt. Men alle anbefalede forholdsregler for håndtering af blodderivater skal overholdes. Se HHS Publication no. (CDC) 88-8395 eller tilsvarende lokale/nationale retningslinjer for sikkerhedsprocedurer for laboratorier.

NØDVENDIGE, MEN IKKE MEDFØLGENDE MATERIALER

- Pipetter til 25µl, 50, 100, 200 og 1000 µl (repetitionspipetter foretrækkes til tilsætning af enzymkonjugatopløsning, Substrate TMB og Stop Solution)
- Bægerglas og målebægre til klargøring af reagenser
- Redestilleret vand
- Reagensglas med hætter, 3.5 ml
- Mikropladeaflæser (450 nm-filter)
- Rystebord (Anbefalet hastighed er 700–900 omdrejninger per minut, orbital bevægelse)
- Vasker til mikrotiterplader
- Passende mixer (vortex)

REAGENSER

Hvert Mercodia Oxidized LDL ELISA kit indeholder reagenser til 96 brønde, nok til 40 prøver og en kalibratorkurve i dublet. Til større analyseserier skal der bruges puljereagenser fra pakker med samme lotnummer. Udløbsdatoen for hele kittet er angivet på den yderste etiket. Den anbefalede opbevaringstemperatur er 2–8°C.

Coated Plate Monoklonalt anti-oxideret LDL fra mus Ved ubrugte mikrotiterpladebrønde skal posen genforsegles med klæbebånd. Opbevares ved 2–8°C og bruges inden for 2 måneder	1 plade Strimler med 8 brønde	96 brønde	Klar til brug
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 Humant oxideret LDL Farvekodet gul Koncentration angivet på hætteglasets etiket Opbevaring efter rekonstituering: 2-8°C for 1 uge Opbevaring af rekonstitueret Calibrator i mere end en uge bør ske ved –20°C.	5 hætteglas	1000 µl	Frystørret Tillsæt 1000 µl redestilleret vand pr. hætteglas
Calibrator 0 Farvekodet gul	1 hætteglas	1000 µl	Klar til brug
Controls (H), (L) Koncentration angivet på hætteglasets etiket Opbevaring efter rekonstituering: 2-8°C for 1 uge Opbevaring af rekonstitueret Calibrator i mere end en uge bør ske ved –20°C.	2 hætteglas	1000 µl	Frystørret Tillsæt 1000 µl redestilleret vand pr. hætteglas
Enzyme Conjugate11X Peroxidas-konjugeret fra mus monoklonalt anti-apoB	1 hætteglas	1.2 ml	Klargøring, se nedenfor
Enzyme Conjugate Buffer Farvekodet blå	1 hætteglas	12 ml	Klar til brug
Assay Buffer Farvekodet rød	1 hætteglas	12 ml	Klar til brug
Sample Buffer 4X Farvakodet gul *Bemærk!* De kan forekomme bundfald, når det opbevares ved 2-8°C. Lad Sample Buffer 4X nå stuetemperatur. Omryst eller bland med votex-blander, intil bundfaldet er opløst. Opbevaring efter fortyndning: 2-8°C for 4 uger.	1 flaske	50 ml	Fortynd med 150 ml redestilleret vand for at lave sample buffer 1X opløsning.
Wash Buffer 21X Opbevaring efter fortyndning: 2-8°C for 4 uger.	1 flaske	50 ml	Fortynd med 1000 ml redestilleret vand for at lave wash buffer 1X opløsning.
Substrate TMB Farveløs opløsning *Bemærk! Lysfølsom!*	1 hætteglas	22 ml	Klar til brug
Stop Solution 0.5 M H_2SO_4	1 hætteglas	7 ml	Klar til brug

Forberedelse af enzyme conjugate 1X opløsning

Forbered den påkrævede mængde enzyme conjugate 1X opløsning ved at fortynde Enzyme Conjugate 11X (1+10) i Enzyme Conjugate Buffer i henhold til tabellen nedenfor. Hvis der forberedes enzyme conjugate 1X opløsning til en hel plade, hæld hele indeholdet af Enzyme Conjugate Buffer over i Enzyme Conjugate 11X røret. Bland forsigtigt.

Antal strimler	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 strimler	1 hætteglas	1 hætteglas
8 strimler	700 µl	7.0 ml
6 strimler	500 µl	5.0 ml
4 strimler	350 µl	3.5 ml

Opbevaring efter fortynding: 2-8°C i en måned.

UDTAGNING OG HÅNDTERING AF PRØVER

Det anbefales at bruge frisk EDTA-plasma til prøver i Mercodia Oxidized LDL ELISA. Der kan også bruges heparinplasma og serum.

Plasma

Tag blod ved venepunktur i rør med EDTA eller heparin som antikoagulant, og adskil plasmafraktionen. Prøver kan opbevares ved –80 °C i mindst seks måneder. Undgå at nedfryse og optø af flere omgange.

Serum

Tag blod ved venepunktur, lad det koagulere, og adskil serummet ved centrifugering. Prøver kan opbevares ved –80 °C i mindst seks måneder. Undgå at nedfryse og optø af flere omgange.

FORTYNDING AF PRØVER

Klargør to rør til hver patientprøve. Hver prøve skal fortyndes i to trin til en endelig fortynding på 1/6561 på følgende måde:

1	Patientprøve	25 µl	
	Sample buffer 1X opløsning	2000 µl	
	Sæt hætte på rørene, vend tre gange og bland i Vortex-blander*		Fortynding 1/ 81
2	1/81-fortynding af prøve	25 µl	
	Sample buffer 1X opløsning	2000 µl	
	Sæt hætte på rørene, vend tre gange og bland i Vortex-blander*		Fortynding 1/ 6561

*Det er VIGTIGT at sikre, at hver enkelt fortynding blandes grundigt, før der fortsættes.

Efter denne fremgangsmåde er prøverne fortyndet 1/6561.

TESTPROCEDURE

Alle reagenser og prøver skal bringes till stuetemperatur før brug. Lav en kalibreringskurve til hver analysekørsel.

1 Forbered enzym conjugate 1X opløsning, sample buffer 1X opløsning, wash buffer 1X opløsning og prøver.
2 Klargør tilstrækkeligt med mikrotiterpladebrønde til Calibrators, Controls og prøver.
3 Pipetter 25 µl af både Calibrators, Controls og prøver i de relevante brønde.
4 Tilsæt 100 µl Assay Buffer i hver brønd.
5 Inkuber på et rystebord (700-900 rpm) i 2 time ved stuetemperatur (18–25°C).
6 Vask 6 gange med 700 µl wash buffer 1X opløsning per brønd, anvend en automatisk pladevasker med overflow funktion. Benyt ikke soak funktion i vaske proceduren.
Eller manuelt:
Bortkast væsken i pladen ved at vende den på hovedet over en vask. Tilsæt 350 µl wash buffer 1X opløsning til hver brønd. Bortkast wash buffer 1x opløsningen, bank pladen flere gange mod absorberende papir for at fjerne overskydende væske. Gentag 5 gange. Undgå at forlænge perioden hvor brøndene står med væske i løbet af vaskeperioden.
7 Tilsæt 100 µl enzyme conjugate 1X opløsning i hver brønd.
8 Inkuber på et rystebord i 1 time ved stuetemperatur (18–25°C).
9 Vask som beskrevet ovenfor.
10 Tilsæt 200 µl Substrate TMB.
11 Inkuber i 15 minutter ved stuetemperatur.
12 Tilsæt 50 µl Stop Solution til hver brønd.
Placer pladen på et rystebord i cirka 5 sekunder for at sikre blandingen.
13 Aflæs optisk densitet ved 450 nm, og beregn resultaterne.
Aflæs inden for 30 minutter.

Obs! For at forhindre kontermination mellem konjugatet og substratet, anbefales det at anvende særskilte pipetter.

Dansk

INTERN KVALITETSKONTROL

Kommercielle Kontroller og/eller interne serumpuljer med lave, mellem og høje oxideret LDL-koncentrationer skal regelmæssigt analyseres som prøver, og resultaterne afbildes fra dag till dag. Det er god laboratoriepraksis at registrere følgende data for hver analyse: kittets partinummer, rekonstitueringdatoer for kittets komponenter, OD-værdier for blindprover, Calibrators og Controls.

BEREGNING AF RESULTATER

Computerberegning

Computerstyret datareduktion af absorbansen for Calibrator, udder Calibrator 0, i forhold till koncentration ved hjælp af cubic spline-regression skal udføres for at opnå koncentrationene af oxideret LDL. Gang koncentrationen for de prøver med fortyndingsfaktoren (f.eks. × 6561).

Manuel beregning

1. Plot de absorbansværdier, der er opnået for Calibrator, udder Calibrator 0, mod oxideret LDL koncentrationen på lin-logaritmisk papir, og tegn en kalibratorkurve.
2. Aflæs koncentrationen for de Controls og prøver fra kalibratorkurven.
3. Gang koncentrationen for de prøver med fortyndingsfaktoren (f.eks. × 6561).

Eksempel på resultater

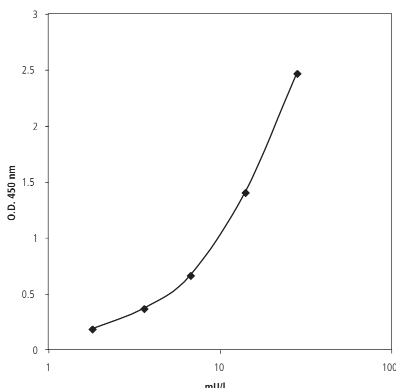
Brønde	Identitet	A_{450}	Konc. mU/l	U/l**
1A-B	Calibrator	0,072		
1C-D	Calibrator 1*	0.185		
1E-F	Calibrator 2*	0.369		
1G-H	Calibrator 3*	0.664		
2A-B	Calibrator 4*	1.405		
2C-D	Calibrator 5*	2.469		
2E-F	Control (H)	1.234	12.2	80.04
2G-H	Control (L)	0.513	5.2	34.12

*Koncentration angivet på hætteglassets etiket.

**Resultat multipliceret med fortyndningens faktor (× 6561).

Eksempel på kalibratorkurve

Der vises en typisk kalibratorkurve. Brug ikke denne kurve til at bestemme faktiske analyse-resultater.



PROCEDURENS BEGRÆNSNINGER

Som ved alle diagnosticeringsanalyser må en definitiv klinisk diagnose ikke baseres på resultatet af en enkelt analyse, men skal foretages af lægen, efter at alle kliniske resultater er blevet bedømt.

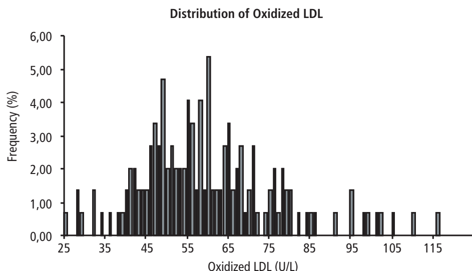
Stærkt lipæmiske, ikteriske eller hæmolyserede prøver forstyrrer ikke analysen.

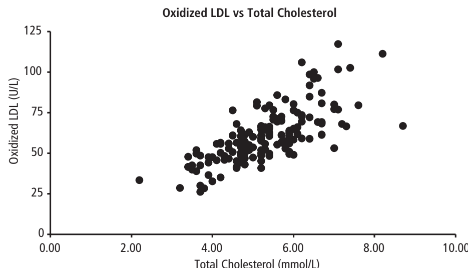
Dansk

FORVENTEDE VÆRDIER

God praksis foreskriver, at hvert laboratorium fastlægger sine egne intervaller for forventede værdier. Følgende resultater kan fungere som en vejledning, indtil laboratoriet selv har indsamlet tilstrækkelige data.

Følgende resultater blev opnået fra 149 ambulante, tilfældigt udvalgte individer i Stockholm-området i Sverige.





Følgende resultater blev opnået fra 149 ambulante, tilfældigt udvalgte individer i Stockholm-området i Sverige.

	gennesmit	medianværdi	interval
OxLDL (U/l)*	61	59	26–117
Kolesterol/HDL forhold**	4.10	3.90	1.68–7.89

* Arbitrære enheder. Se KALIBRERING.

** Målte data Kolesterol (mmol/l) og HDL (mmol/l).

Fordeling af oxideret LDL og Kolesterol/HDL-forhold

Oxideret LDL U/l	Kolesterol/HDL forhold	Patient/Total (%)	
	Quartile 1		
Q1 (26–49)	1.68–3.13	22/149	(14.8)
Q2 (50–59)	1.68–3.13	10/149	(6.7)
Q3 (60–69)	1.68–3.13	5/149	(3.4)
Q4 (70–117)	1.68–3.13	0/149	(0.0)
	Quartile 2		
Q1 (26–49)	3.21–3.86	7/149	(4.7)
Q2 (50–59)	3.21–3.86	17/149	(11.4)
Q3 (60–69)	3.21–3.86	10/149	(6.7)
Q4 (70–117)	3.21–3.86	3/149	(2.0)
	Quartile 3		
Q1 (26–49)	3.87–4.79	7/149	(4.7)
Q2 (50–59)	3.87–4.79	11/149	(7.4)
Q3 (60–69)	3.87–4.79	11/149	(7.4)
Q4 (70–117)	3.87–4.79	9/149	(6.0)
	Quartile 4		
Q1 (26–49)	4.80–7.89	1/149	(0.7)
Q2 (50–59)	4.80–7.89	4/149	(2.7)
Q3 (60–69)	4.80–7.89	7/149	(4.7)
Q4 (70–117)	4.80–7.89	25/149	(16.8)

Følgende resultater blev opnået fra 147 ambulante, tilfældigt udvalgte individer i Stockholm-området i Sverige.

	gennesmit	medianværdi	interval
OxLDL (U/l)*	61	59	26–117
LDL/HDL forhold**	2.51	2.36	0.55–5.56

* Arbitrære enheder. Se KALIBRERING.
** Målte data LDL (mmol/l) og HDL (mmol/l).

Fordeling af oxideret LDL og LDL/HDL-forhold

Oxideret LDL U/l	LDL/HDL forhold		Patient/Total (%)	
		Quartile 1		
Q1 (26–49)	0.55–1.79		19/147	(13.0)
Q2 (50–59)	0.55–1.79		12/147	(8.2)
Q3 (60–69)	0.55–1.79		6/147	(4.1)
Q4 (70–117)	0.55–1.79		0/147	(0.0)
		Quartile 2		
Q1 (26–49)	1.79–2.33		10/147	(6.8)
Q2 (50–59)	1.79–2.33		13/147	(8.8)
Q3 (60–69)	1.79–2.33		10/147	(6.8)
Q4 (70–117)	1.79–2.33		3/147	(2.0)
		Quartile 3		
Q1 (26–49)	2.36–3.08		8/147	(5.4)
Q2 (50–59)	2.36–3.08		11/147	(7.5)
Q3 (60–69)	2.36–3.08		10/147	(6.8)
Q4 (70–117)	2.36–3.08		8/147	(5.4)
		Quartile 4		
Q1 (26–49)	3.09–5.56		0/147	(0.0)
Q2 (50–59)	3.09–5.56		5/147	(3.4)
Q3 (60–69)	3.09–5.56		8/147	(5.4)
Q4 (70–117)	3.09–5.56		24/147	(16.3)

YDEEVNE

Registreringsgrænse

Registreringsgrænsen er <1 mU/l, beregnet som tre standardafvigelser over Calibrator 0

Genfinding

Genfinding efter tilsætning er 85–107% (gennemsnit 95%)

Nøjagtighed

Hver prøve analyseres 3 prøver 3–8 gange ved 20 forskellige lejligheder.

Prøve	Gennemsnit	Variationskoefficient		
	mU/l	inden for analyse %	mellem analyse %	samlet analyse %
1	8.5	5.5	6.2	8.3
2	19	7.3	4.0	8.3
3	32	6.2	4.0	7.4

Fortynding

Prøve	Dilution	Opnået værdier mU/l	Opnået/ Førventede
		(Assay 1/ Assay 2)	
Prøve 1	1:3321		
	1:6642	19.9/18.3	
	1:13284	9.4/9.5	0.94/1.04
Prøve 2	1:3321	–	
	1:6642	20.6/20.4	
	1:13284	10.6/9.8	1.02/0.97
Prøve 3	1:3321	29.1/32.0	
	1:6642	15.6/15.5	1.07/0.97
	1:13284	7.7/8.0	1.05/1.00
Prøve 4	1:3321	21.6/20.2	
	1:6642	10.4/10.4	0.97/1.03
	1:13284	5.9/5.7	1.08/1.12
Prøve 5	1:3321	15.9/15.7	
	1:6642	8.1/8.0	1.02/1.02
	1:13284	4.0/4.4	1.02/1.13

Gennemsnit opnået/ förventede værdier er 1.03, interval 0.94–1.13.

Kalibrering

Der findes på nuværende tidspunkt ingen international reference. Mercodia Oxidized LDL ELISA er kalibreret i relative arbitrærer enheder, overfor en intern reference præparation.

GARANTI

De angivne ydeevnedata blev opnået ved af den angivne fremgangsmåde. Alle ændringer af fremgangsmåden, der ikke anbefales af Mercodia AB, kan påvirke resultaterne, og i dette tilfælde ophæver Mercodia AB alle garantier, det være sig udtrykkelige, stiltiende eller lovbefalede, herunder den stiltiende garanti for salgbarhed og egnethed til et bestemt formål.

I et sådant tilfælde kan Mercodia AB og dennes autoriserede distributører ikke drages til ansvar for indirekte skader eller følgeskader.

ANVÄNDNING

Mercodia Oxidized LDL ELISA är ett *in vitro* test för kvantitativ bestämning av humant oxiderat LDL (Low Density Lipoprotein) i serum och plasma. Lipoproteinbestämningar används vid diagnos och behandling av lipidrubbningar (t.ex. diabetes mellitus), ateroskleros och olika lever- och njursjukdomar.

SAMMANFATTNING OCH FÖRKLARING AV TESTET

Idag anses omvandlingen av LDL till oxiderat LDL , vara ett centralt steg i initieringen och utvecklingen av ateroskleros. I ett flertal arbeten har man visat att nativt LDL omvandlas till oxiderat LDL och att oxiderat LDL är den aterogena formen av LDL [1–5]. Oxiderat LDL återfinns i monocytderiverade makrofager i aterosklerotiska plack, men inte i friska artärer [6].
LDL tas inte upp av makrofager via den klassiska Brown/Goldstein LDL receptorn [7]. Studier har fastställt att LDL, den främsta bäraren av vårt blodkolesterol, först måste omvandlas till oxiderat LDL varefter det kan kan tas upp av makrofager via den s k renhållningsreceptor eller ”oxiderat LDL receptorn” på makrofagerna. Bindningen av oxiderat LDL till makrofager är ett avgörande steg i den mekanism genom vilken oxiderat LDL orsakar ansamling av kolesterol i makrofagerna, som därigenom omvandlas till lipidfyllda s k skumceller.

Holvoet *et al*. [9] var de första som tydligt visade att patienter med kranskärlsjukdom hade avsevärt förhöjda plasmanivåer av oxiderat LDL och att cirkulerande nivåer av oxiderat LDL även var förhöjt hos patienter med stabil kranskärlssjukdom samt patienter med akut koronarsjukdom. De fann vidare att plasmanivåerna av oxiderat LDL var signifikant högre hos patienter med stabil angina, instabil angina och akut hjärtinfarkt vid jämförelse med förmodat friska kontrollpersoner av samma ålder.

I Holvoets arbeten [9-13] mättes plasmanivåer av oxiderat LDL med ett kompetitivt ELISA test, i vilken den oxiderat LDL specifika monoklonala antikroppen mab-4E6 användes. Mercodia Oxidized LDL ELISA använder samma specifika monoklonala antikropp, mAb-4E6, som Holvoet [9,10] använde i sina analyser. Mercodia Oxidized LDL ELISA test baserar sig på ”sandwich” teknik, där oxiderat LDL i provet reagerar med den specifika antikroppen 4E6 bunden till mikrotiterplattans fasta fas.

Mercodia Oxidized LDL ELISA har använts av kliniska forskare i en rad uppmärksammade studier. Hulthe och Fagerberg [14] fastställde förhållandet mellan subklinisk ateroskleros och cirkulerande nivåer av oxiderat LDL genom att visa ett samband mellan nivåerna av oxiderat LDL och intima-media-tjockleken och förekomsten av plack i karotis och femoralis artärerna. Sigurdardottir, Fagerberg och Hulthe [15] hittade förhöjda nivåer av oxiderat LDL hos patienter med metaboliskt syndrom. De fann dessutom att förhöjda nivåer av oxiderat LDL hos patienter med metaboliskt syndrom korrelerade med liten LDL-partikelstorlek. Kopprasch *et al.* [16] fann förhöjda nivåer av cirkulerande oxiderat LDL hos patienter med nedsatt glukostolerans (IGT). Duntas, Mantzou, och Koutras [17] fann avsevärt förhöjda plasmanivåer av oxiderat LDL hos obehandlade patienter med hypotyreos.

Vid American Heart Association Scientific Sessions 2002 rapporterade Johnston *et al.* [18] att plasmanivåer av oxiderat LDL var betydligt högre hos patienter med instabil kranskärlssjukdom än hos friska kontrollpersoner. En mycket viktig samtidig upptäckt i denna studie var att man inte fann någon signifikant skillnad mellan kolesterolnivåerna hos patienter med instabil kranskärlssjukdom och hos friska kontrollpersoner. (Referenser sida 93).

PRINCIP FÖR PROCEDUREN

Mercodia Oxidized LDL ELISA är en fast fas enzym immunoassay som baserar sig på ”sandwich” teknik med två monoklonala antikroppar som är riktade mot separata antigendeterminanter på den oxidativt modifierade apolipoprotein B molekylen. Under inkubation reagerar oxiderat LDL i provet med specifik antikropp, mab-4E6, bunden till mikrotiterplattans fasta fas. Efter tvätt, där ickereaktiva plasmakomponenter avlägsnas, känner peroxidaskonjugerad anti-human apolipoprotein B antikropp igen det oxiderade LDL som är bundet till fasta fasen. Efter en andra inkubation och en enkel tvätt för att avlägsna obunden enzyminmärkt antikropp, detekteras det bundna konjugatet genom reaktion med 3,3’,5,5’-tetrametylbenzidin (TMB). Enzymreaktionen avläses spektrofotometriskt efter att ha stoppats genom tillsats av syra.

VARNINGAR OCH FÖRSIKTIGHETSÅTGÄRDER

- För *in vitro* diagnostiskt bruk. Ej för intern eller externt bruk på människor eller djur.
- Innehållet i detta kit eller rester av det får inte komma i kontakt med idisslande djur eller svin.
- Stop Solution i detta kit innehåller 0.5 M H_2SO_4. Följ standardsäkerhetsåtgärder för hantering av farliga kemikalier.
- Alla patientprover skall hanteras som om de vore smittbärande.

Varning! Detta kit innehåller komponenter som kan vara smittbärande !

Detta kit innehåller komponenter som är framställda från humana blodderivat. Källmaterialet har med hjälp av immunanalys testats för förekomst av hepatit B ytantigen, antikroppar mot hepatit C virus och antikroppar mot HIV virus och funnits vara negativa. Alla försiktighetsåtgärder gällande hantering av blodderivat ska dock iakttas. Information finns i HHS publikationsnummer (CDC) 88-8395 eller motsvarande lokala/nationella riktlinjer för säkerhetsprocedurer på laboratorier.

MATERIAL SOM KRÄVS MEN EJ TILLHANDAHÅLLS

- Pipetter för 25 µl,50 µl, 100 µl, 200 µl and 1000 µl (repeterbara pipetter är att föredra för tillsats av enzymkonjugatlösning, Substrate TMB och Stop Solution)
- Bägare och mätglas för iordningställande av reagens
- Destillerat vatten
- Provrör med kork, 3.5 ml
- Mikrotiterplattläsare med 450 nm filter
- Plattskak (Rekommenderad hastighet är 700-900 varv per minut, orbital rörelse)
- Tvättutrustning för mikrotiterplattor
- Lämplig mixer

REAGENSER

Varje Mercodia Oxidized LDL ELISA kit innehåller reagenser till 96 brunnar tillräckligt för 40 prover, två kontroller och en kalibratorkurva i duplikat. För större analysserier, använd sammanslagnareagenser från förpackningar med identiska lotnummer. Utgångsdatum för hela kitet står på ytteretiketten. Rekommenderad förvaringstemperatur är 2–8°C.

Coated Plate Monoklonalt mus-anti-oxiderat LDL För oanvända mikrotiterstrips, återförslut påsen med tejp. Förvara vid 2–8°C och använd inom två månader.	1 platta	96 brunnar Strips med 8 brunnar	Färdig att användas
Calibrators 1, 2, 3, 4, 5 Humant oxiderat LDL Gul färgmärkning Koncentration angiven på etikett Förvaring efter rekonstituering: 2-8°C i 1 vecka. För förvaring av rekonstituerade Calibrators i mer än 1 vecka, förvara vid -20°C	5 flasor	1000 µl	Frystokade Tillsätt 1000 µl destillerat vatten per flaska
Calibrator 0 Gul färgmärkning	1 flaska	1000 µl	Färdig att användas
Controls (H), (L) Koncentration angiven på etikett Förvaring efter rekonstituering: 2-8°C i 1 vecka. För längre förvaring av rekonstituerade Calibrators, förvara vid -20°C.	2 flasor	1000 µl	Frystokade Tillsätt 1000 µl destillerat vatten per flaska
Enzyme Conjugate11X Peroxidaskonjugerat monoklonalt mus-anti-apoB	1 flaska	1.2 ml	Spädning enligt nedan
Enzyme Conjugate Buffer Blå färgmärkning	1 flaska	12 ml	Färdig att användas
Assay Buffer Röd färgmärkning	1 flaska	12 ml	Färdig att användas
Sample Buffer 4X Gul färgmärkning *Observera!* Fällning kan förekomma när lösningen förvarats vid 2-8°C. Låt Sample Buffer 4X nå rumstemperatur. Mixa tills fällningen har lösts upp. Förvaring efter spädning: 2-8°C i 4 veckor.	1 flaska	50 ml	Späd med 150 ml destillerat vatten för att bereda sample buffer 1X-lösning.
Wash Buffer 21X Förvaring efter spädning: 1 månad vid 2-8°C.	1 flaska	50 ml	Späd med 1000 ml destillerat vatten för att bereda wash buffer 1X-lösning.
Substrate TMB Färglös vätska *Obs! Ljuskänslig!*	1 flaska	22 ml	Färdig att användas
Stop Solution 0.5 M H_2SO_4	1 flaska	7 ml	Färdig att användas

Beredning av enzyme conjugate 1X-lösning

Bered önskad mängd enzyme conjugate 1X-lösning genom att späda Enzyme Conjugate 11X (1+10) i Enzyme Conjugate Buffer enligt tabellen nedan. Vid beredning av enzyme conjugate 1X-lösning till hela plattan, hälls hela innehållet av Enzyme Conjugate Buffer i flaskan med Enzyme Conjugate 11X. Blanda varsamt.

Antal strips	Enzyme Conjugate 11X	Enzyme Conjugate Buffer
12 strips	1 flaska	1 flaska
8 strips	700 µl	7.0 ml
6 strips	500 µl	5.0 ml
4 strips	350 µl	3.5 ml

PROVTAGNING OCH HANTERING

Det rekommenderas att färsk EDTA-plasma används i Mercodia Oxidized LDL ELISA. Serum och heparinplasma kan även användas.

Plasma

Ta blod genom venpunktion i rör som innehåller heparin eller EDTA som motverkar koagulation och separera plasmadelen genom centrifugering. Prover kan förvaras vid –80°C i upp till sex månader. Undvik upprepad frysning och upptining.

Serum

Ta blod genom venpunktion, låt det koagulera, och separera serumet genom centrifugering. Prover kan förvaras vid –80°C i upp till sex månader. Undvik upprepad frysning och upptining.

PROVBEHANDLING

Förbered två rör för varje patientprov. Vart och ett av proverna måste spädas i två steg till en slutgiltig spädning på 1/6561 enligt följande:

1	Patientprov	25 µl	
	Sample buffer 1X-lösning	2000 µl	
	Sätt kork på rören, vänd tre gånger och blanda med Vortex*		Spädning 1/ 81
2	1/81 spädning av prov	25 µl	
	Sample buffer 1X-lösning	2000 µl	
	Sätt kork på rören, vänd tre gånger och blanda med Vortex*		Spädning 1/6561

* Det är VIKTIGT att varje spädning blandas ordentligt före fortsatt användning.

Denna procedur ger att proverna blir spädda till 1/6561.

TESTPROCEDUR

Alla reagenser och prover måste rumstempereras före användning.
En kalibratorkurva skall ingå i varje analys.

1 Bered enzyme conjugate 1X-lösning, sample buffer 1X-lösning, wash buffer 1X-lösning och prover.
2 Gör iordning tillräckligt med mikrotiterbrunnar för att rymma Calibtrators, Controls och prover i duplikat.
3 Pipettera 25 µl av vardera av Calibrators, Controls och utspädda prover i lämpliga brunnar.
4 Tillsätt 100 µl Assay Buffer till varje brunn.
5 Inkubera på en plattskak (700-900 rpm) under 2 timmar vid rumstemperatur (18–25°C).
6 Tvätta 6 gånger med 700 µl wash buffer 1X-lösning per brunn, använd en automatisk microtiterplatt-tvätt med overflow-funktion. Använd inte soak-funktion vid tvättproceduren. Eller manuellt,
   Avlägsna reaktionslösningen genom att vända microtiterplattan upp och ner över en slask. Tillsätt 350 µl tvättlösning till varje brunn. Avlägsna wash buffer1X-lösningen, knacka plattan bestämt flera gånger på absorberande papper för att ta bort överfödig vätska. Upprepa 5 gånger. <u>Undvik långvarig soak under tvättproceduren.</u>
7 Tillsätt 100 µl enzyme conjugate 1X-lösning till varje brunn.
8 Inkubera på plattskak under 1 timme vid rumstemperatur (18–25°C).
9 Tvätta enligt beskrivningen ovan.
10 Tillsätt 200 µl Substrate TMB till varje brunn.
11 Inkubera i 15 minuter vid rumstemperatur. Skaka inte.
12 Tillsätt 50 µl Stop Solution i varje brunn. Placera plattan på en plattskak i 5 sekunder för att säkerställa att lösningen är ordentligt blandad.
13 Avläs optisk densitet vid 450 nm och beräkna resultaten. Avläs inom 30 minuter.

Obs! För att undvika kontamination rekommenderas att separata pipetter används för konjugat och substrat.

INTERN KVALITETSKONTROLL

Kommersiella kontroller och/eller interna kontrollprover med låga, mellan och höga oxiderat LDL koncentrationer bör regelmässigt analyseras som prover och resultaten kartläggas dag för dag. Det tillhör goda laboratorierutiner att anteckna följande uppgifter vid varje analystillfälle: kitets lotnummer, kitkomponenternas rekonstitutionsdatum, OD-värden för Blank, Calibrators och Controls.

BERÄKNING AV RESULTATEN

Datorberäkning

Kalibratorkurva kan konstrueras genom att använda ”cubic spline regression” med absorbans-värdena för Calibrators, utan Calibrator 0, mot oxiderat LDL koncentrationen. Multiplicera koncentrationen för Controls de proverna med spädningsfaktorn (t.ex. × 6561).

Manuell beräkning

1. Märk ut absorbansvärdena som erhålls för Calibrator, utan Calibrator 0, mot oxidierat LDL koncentrationen på ett lin-logpapper och konstruera en kalibratorkurva.
2. Avläs provernas koncentration från kalibratorkurva.
3. Multiplicera koncentrationen för Controls och prover med spädningsfaktorn (t.ex. × 6561).

Exempel på resultat

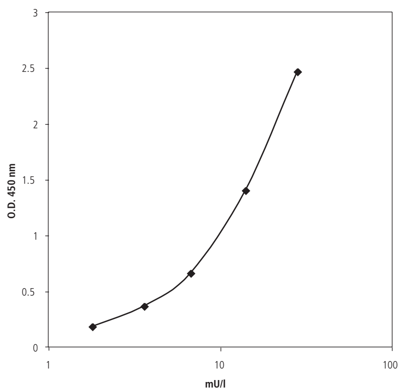
Brunnar	Identitet	A_{450}	Konc. mU/l	U/l**
1A-B	Calibrator	0,072		
1C-D	Calibrator 1*	0.185		
1E-F	Calibrator 2*	0.369		
1G-H	Calibrator 3*	0.664		
2A-B	Calibrator 4*	1.405		
2C-D	Calibrator 5*	2.469		
2E-F	Control (H)	1.234	12.2	80.04
2G-H	Control (L)	0.513	5.2	34.12

*Koncentrationen anges på flaskans etikett.

**Resultaten har multiplicerats med spädningsfaktorn (× 6561).

Exempel på kalibratorkurva

En typisk kalibratorkurva visas här. Använd inte den här kurvan för att fastställa verkliga testresultat.



METODENS BEGRÄNSNINGAR

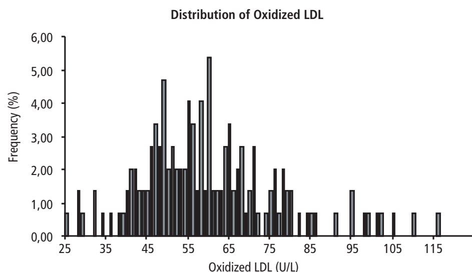
I likhet med alla andra diagnostiska tester, bör man inte basera en definitiv klinisk diagnos på resultatet från ett enstaka test. Diagnosen bör ställas av en läkare efter att alla kliniska fynd har utvärderats.

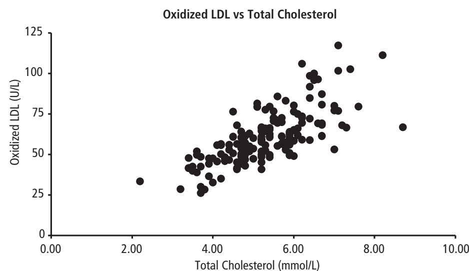
Starkt lipemiska, ikteriska eller hemolyserade prover påverkar inte testresultatet.

FÖRVÄNTADE VÄRDEN

Det tillhör god laboratorierutin (good practice) att varje laboratorium skall fastställa sina egna förväntade värden. Följande resultat kan tjäna som en vägledning till dess att laboratoriet har samlat tillräckligt med egna uppgifer.

Följande resultat erhölls från 149 slumpmässigt utvalda individer i Stockholmsområdet, Sverige.





Följande resultat erhölls från 149 slumpmässigt utvalda individer i Stockholmsområdet, Sverige.

	Medelvärde	Median	Mätområde
Oxiderat LDL (U/l)*	61	59	26–117
Kolesterol/HDL-kvot**	4.10	3.90	1.68–7.89

* Arbiträra enheter. Se KALIBRERING.

** Mätresultat av Cholesterol (mmol/l) och HDL (mmol/l).

Fördelning av oxiderat LDL och Cholesterol/HDL-kvot

Oxiderat LDL U/l	Kolesterol/HDL Kvot	Patient/Totalt	(%)
	Kvartil 1		
Q1 (26–49)	1.68–3.13	22/149	(14.8)
Q2 (50–59)	1.68–3.13	10/149	(6.7)
Q3 (60–69)	1.68–3.13	5/149	(3.4)
Q4 (70–117)	1.68–3.13	0/149	(0.0)
	Kvartil 2		
Q1 (26–49)	3.21–3.86	7/149	(4.7)
Q2 (50–59)	3.21–3.86	17/149	(11.4)
Q3 (60–69)	3.21–3.86	10/149	(6.7)
Q4 (70–117)	3.21–3.86	3/149	(2.0)
	Kvartil 3		
Q1 (26–49)	3.87–4.79	7/149	(4.7)
Q2 (50–59)	3.87–4.79	11/149	(7.4)
Q3 (60–69)	3.87–4.79	11/149	(7.4)
Q4 (70–117)	3.87–4.79	9/149	(6.0)
	Kvartil 4		
Q1 (26–49)	4.80–7.89	1/149	(0.7)
Q2 (50–59)	4.80–7.89	4/149	(2.7)
Q3 (60–69)	4.80–7.89	7/149	(4.7)
Q4 (70–117)	4.80–7.89	25/149	(16.8)

Följande resultat erhölls från 147 slumpmässigt utvalda individer i Stockholmsområdet, Sverige.

	Medelvärde	Median	Mätområde
Oxiderat LDL (U/l)*	61	59	26–117
LDL/HDL-kvot**	2.51	2.36	0.55–5.56

* Arbiträra enheter. Se KALIBRERING.

** Mätresultat av LDL (mmol/l) och HDL (mmol/l).

Fördelning av oxiderat LDL och LDL/HDL-kvot

Oxiderat LDL U/l	LDL/HDL Kvot	Patient/Totalt (%)	
	Kvartil 1		
Q1 (26–49)	0.55–1.79	19/147	(13.0)
Q2 (50–59)	0.55–1.79	12/147	(8.2)
Q3 (60–69)	0.55–1.79	6/147	(4.1)
Q4 (70–117)	0.55–1.79	0/147	(0.0)
	Kvartil 2		
Q1 (26–49)	1.79–2.33	10/147	(6.8)
Q2 (50–59)	1.79–2.33	13/147	(8.8)
Q3 (60–69)	1.79–2.33	10/147	(6.8)
Q4 (70–117)	1.79–2.33	3/147	(2.0)
	Kvartil 3		
Q1 (26–49)	2.36–3.08	8/147	(5.4)
Q2 (50–59)	2.36–3.08	11/147	(7.5)
Q3 (60–69)	2.36–3.08	10/147	(6.8)
Q4 (70–117)	2.36–3.08	8/147	(5.4)
	Kvartil 4		
Q1 (26–49)	3.09–5.56	0/147	(0.0)
Q2 (50–59)	3.09–5.56	5/147	(3.4)
Q3 (60–69)	3.09–5.56	8/147	(5.4)
Q4 (70–117)	3.09–5.56	24/147	(16.3)

ANALYTISKA PRESTANDA EGENSKAPER

Detektionsgräns

Detektionsgränsen är < 1 mU/l och beräknas som tre standardavvikelser över Calibrator 0.

Recovery

Recovery vid tillsats är 85–107% (95%).

Precision

Varje prov analyserades i 3–8 replikat vid 20 olika tillfällen.

Prov	Erhållet värde	Variationskoefficient		
	mU/l	inom testet (%)	mellan testet (%)	totalt testet (%)
1	8.5	5.5	6.2	8.3
2	19	7.3	4.0	8.3
3	32	6.2	4.0	7.4

Spädningar

Prov	Spädning	Erhållet värde mU/l	Erhållet/ Förväntat
		(Assay 1/ Assay 2)	
Prov 1	1:3321		
	1:6642	19.9/18.3	
	1:13284	9.4/9.5	0.94/1.04
Prov 2	1:3321	–	
	1:6642	20.6/20.4	
	1:13284	10.6/9.8	1.02/0.97
Prov 3	1:3321	29.1/32.0	
	1:6642	15.6/15.5	1.07/0.97
	1:13284	7.7/8.0	1.05/1.00
Prov 4	1:3321	21.6/20.2	
	1:6642	10.4/10.4	0.97/1.03
	1:13284	5.9/5.7	1.08/1.12
Prov 5	1:3321	15.9/15.7	
	1:6642	8.1/8.0	1.02/1.02
	1:13284	4.0/4.4	1.02/1.13

Medelvärde för Erhållet/Förväntat värde är 1.03, intervall 0.94–1.3.

Kalibrering

För närvarande finns ingen internationell referens preparation av oxiderat LDL. Mercodia Oxidized LDL ELISA kalibreras i relativt arbiträra enheter mot en intern referens preparation av humant oxiderat LDL.

GARANTI

De uppgifter som presenteras här erhölls med användning av påvisat förfarande. Förändringar eller modifieringar av förfarandet som inte rekommenderas av Mercodia AB kan påverka resultaten. I dessa fall frånsäger sig Mercodia AB allt ansvar, underförstått såväl som lagstadgat, inklusive underförstådd säljbarhets- användarbarhetsgaranti.

Mercodia AB och deras auktoriserade distributörer skall i dessa fall inte hållas ansvariga för direkta eller indirekta skador.

REFERENCES/REFERENZEN/RÉFÉRENCES/REFERENCIAS/RIFERIMENTI/ REFERENCER/REFERENSER

1. Steinberg D (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 272:20963–20966
2. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ (1995) Atherosclerosis: basic mechanisms: oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 91:2488–2496
3. Steinberg D (1997) Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 95:1062–1071
4. Heinecke JW (1998) Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* 141:1–15
5. Witztum JL, Horkko S (1997) The role of oxidized LDL in atherogenesis: immunological re-sponse and anti-phospholipid antibodies. *Ann N Y Acad Sci* 811:88–99
6. Yla-Herttuala S (1998) Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo? *Curr Opin Lipidol* 9:337–344
7. Brown, MS, Goldstein JL (1983) Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 52:223–226
8. Chisolm, GM, Hazen, SL, Fox, PL, Cathcart, MK (1999) The oxidation of lipoproteins by monocyte-macrophages. *J Biol Chem* 274:25959–25962
9. Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van de Werf F, Collen D (1998) Oxidized LDL and mal-ondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation* 98:1487–1494
10. Holvoet P, Ann Mertens, Peter Verhamme, Kris Bogaerts, Guy Beyens, Raymond Verhaeghe, Désiré Collen, Erik Muls, Frans de Werf (2001) Circulating Oxidized LDL Is a Useful Marker for Identifying Patients With Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:844–848
11. Holvoet P, Satssen J-M., Van Cleemput J, Collen D, Vanhaecke J (1998) Oxidized low den-sity lipoproteins in patients with transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:100–107
12. Holvoet P, Donck J, Landeloos M, Brouwers E, Luijtens K, Arnout J, Lesaffre E, Vanrenterghem Y, Collen D (1996) Correlation between oxidized low density lipoproteins and von Willebrand factor in chronic renal failure. *Thromb Haemost* 76:663–669
13. Holvoet P, Van Cleemput J, Collen D, Vanhaecke J (2000) Oxodized low density lipoprotein is a prognostik´c marker of transplant-associated coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:698–702
14. Hulthe J, Fagerberg B (2002) Circulating oxidized LDL is associated with subclinical ather-osclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1162-1167
15. Sigurdardottir V, Fagerberg B, Hulthe J (2002) Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically healthy 58-year old men (AIR study). *Journal of internal Medicine* 252:440–447

16. Kopprash S, Pietzsch J, Kuhlisch E, Fuecker K, Temelkova-Kurktschiev T, Hanefeld M, Kühne H, Julius U, Graessler J (2002) In vivo evidence for increased oxidation of circulating LDL in impaired glucose tolerance. *Diabetes* 51:3102–3106
17. Duntas LH, Mantzou E, Koutras DA (2002) Circulating levels of oxidized low-density lipoprotein in overt mild hypothyrodism. *Thyroid* 12:1003–1007
18. Johnston N, Lagerqvist B, Siegbahn A, Wallentin L (2002) Oxidized LDL and unstable coro-nary artery disease. Presented at the American Heart Association Scientific Sessions 2002 in Chicago.



SUMMARY PROTOCOL SHEET/ZUSAMMENFASSUNG DES PROTOKOLLBLATTES/ FEUILLE DE PROTOCOLE RESUMEE/HOJA DE RESUMEN DEL PROTOCOLO/PROTOCOLLO DI SINTESI/OVERSIGTSPROTOKOLARK/SAMMANFATTNINGSPROTOKOLL

Mercodia Oxidized LDL ELISA

Add Calibrators and samples	25 µl
Calibrators und Proben beigeben	
Ajout de Calibrators et d'échantillons	
Añadir Calibrators y muestras	
Aggiungere Calibrators e campioni	
Tilsæt Calibrators og prøver	
Tillsätt Calibrators och prover	

Add Assay Buffer	100 µl
Assay Buffer beifügen	
Ajout d´Assay Buffer	
Añadir Assay Buffer	
Aggiungere Assay Buffer	
Tilsæt Assay Buffer	
Tillsätt Assay Buffer	

Incubate	2 hours at 18–25°C on a shaker
Inkubieren	2 Stunden auf einem Schüttler bei 18–25°C
Incubation	2 heures à 18–25°C sur un agitateur secoueur de plaques
Incubar	2 horas a 18–25°C en un agitador de placas
Incubazione	2 ore a 18– 25°C in una piastra shaker
Inkuber	2 timer ved 18–25°C på et rystebord
Inkubera	2 timmar vid 18–25°C på en plattskak

Wash	6 times
Waschen	6 mal
Rinçage	6 rinçages
Lavar	6 veces
Lavare	6 volte
Vask	6 gange
Tvätta	6 gånger

Add enzyme conjugate 1X solution	100 µl
Die Enzyme Conjugate 1X Lösung beifügen	
Ajout le solution d' enzyme conjugate 1X	
Añadir solución de enzyme conjugate 1X	
Aggiungere soluzione di enzyme conjugate 1X	
Tilsæt enzyme conjugate 1X opløsing	
Tillsätt enzyme conjugate 1X lösning	

Incubate	1 hour at 18–25 °C on a shaker
Inkubieren	1 Stunde auf einem Schüttler bei 18–25°C
Incubation	1 heure à 18–25 °C sur un agitateur secoueur de plaques
Incubar	1 hora a 18–25 °C en un agitador de placas
Incubazione	1 ora a 18–25 °C in una piastra shaker
Inkuber	1 time ved 18–25 °C på et rystebord
Inkubera	1 timme vid 18–25 °C på en plattskak

Wash	6 times
Waschen	6 mal
Rinçage	6 rinçages
Lavar	6 veces
Lavare	6 volte
Vask	6 gange
Tvätta	6 gånger

Add Substrate TMB	200 µl
Substrat TMB beigeben	
Ajout de Substrat TMB	
Añadir Substrate TMB	
Aggiungere Substrate TMB	
Tilsæt Substrate TMB	
Tillsätt Substrate TMB	

Incubate	15 minutes
Inkubieren	15 Minuten
Incubation	15 minutes
Incubar	15 minutos
Incubazione	15 minuti
Inkuber	15 minutter
Inkubera	15 minuter

Add Stop Solution	50 µl Shake for 5 sec to ensure mixing
Stop Solution beifügen	50 µl und 5 Sek. gründlich schütteln
Ajout de Stop Solution	50 µl Secouer pendant 5 secondes pour bien mélanger
Añadir Stop Solution	50 µl Agitar durante 5 segundos para asegurar el mezclado
Aggiungere Stop Solution	50 µl Scuotere per 5 secondi per assi curarsi che sia tutto mescolato
Tilsæt Stop Solution	50 µl Ryst i 5 sekunder for sikre blanding
Tillsätt Stop Solution	50 µl Skaka i 5 sekunder för att se till att lösningen blandas

Measure A_{450}
Messung A_{450}
Mesure de A_{450}
Medir A_{450}
Misura A_{450}
Aflæs A_{450}
Mät vid A_{450}

31-3136
Revised 2009-06-17

X-O Graf Tryckeri AB